

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ



М. Дж. Ф. БАРРЕСИ
С. Ф. ГИЛБЕРТ



Лаборатория
ЗНАНИЙ

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

MICHAEL J. F. BARRESI
SCOTT F. GILBERT

DEVELOPMENTAL BIOLOGY

INTERNATIONAL TWELFTH EDITION



SINAUER ASSOCIATES

NEW YORK OXFORD
OXFORD UNIVERSITY PRESS

М. ДЖ. Ф. БАРРЕСИ
С. Ф. ГИЛБЕРТ

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Перевод с английского

под редакцией
доктора биол. наук,
профессора А. В. Васильева

Электронное издание



Москва
Лаборатория знаний
2022

Переводчики:

Е. А. Радугина (гл. 1–4, 21, 22), Ю. В. Храмова (гл. 5–7, 12),
Д. А. Никишин (гл. 8, 9, 10), И. Е. Борисенко (гл. 13, 15, 19),
В. В. Козин (гл. 17, 18), Н. М. Алешина (гл. 11, 20),
Е. Ю. Шмуклер (гл. 14, 16), Ю. Б. Шмуклер (гл. 23, 24)

Барреси М. Дж. Ф.

Б25 Биология развития / М. Дж. Ф. Барреси, С. Ф. Гилберт ;
пер. с англ. под ред. д-ра биол. наук А. В. Васильева. — Электрон. изд. — М. : Лаборатория знаний, 2022. — 803 с. — Систем. требования: Adobe Reader XI ; экран 10". — Загл. с титул. экрана. — Текст : электронный.

ISBN 978-5-00101-984-8

Перевод нового, дополненного 12-го издания «Биологии развития» М. Дж. Ф. Барреси и С. Ф. Гилберта привлекает своей основательностью и возможностью эффективно узнавать о классических принципах и о передовых разработках в этой обширной междисциплинарной области. Книга очень любима, хорошо иллюстрирована и предельно понятно написана.

Обновлены главы об оплодотворении, дроблении, гастрюляции, раннем развитии позвоночных, клеточной дифференцировке и клеточных взаимодействиях в процессе развития. Включена информация о биологии растений в те из них, которые посвящены клеточной спецификации, регуляции генов, клеточной коммуникации, производству гамет, оплодотворению, определению осей, формированию органов и регенерации.

Представлен новый материал о морфомеханике развития во время гастрюляции у дрозофилы и формирования легких млекопитающих. Особое внимание уделено использованию полногеномных подходов, выводящих наше понимание дифференцировки клеток на новый уровень.

Для студентов и аспирантов биологических и медицинских вузов, а также их преподавателей, будет полезна старшеклассникам для более глубокого изучения предмета.

УДК 573
ББК 28.03

Деривативное издание на основе печатного аналога: Биология развития / М. Дж. Ф. Барреси, С. Ф. Гилберт ; пер. с англ. под ред. д-ра биол. наук А. В. Васильева. — М. : Лаборатория знаний, 2022. — 800 с. : ил.

ISBN 978-5-00101-323-5

Developmental Biology, International Twelfth Edition was originally published in English in 2020. This translation is published by arrangement with Oxford University Press. BKL Publishers is solely responsible for this translation from the original work and Oxford University Press shall have no liability for any errors, omissions or inaccuracies or ambiguities in such translation or for any losses caused by reliance thereon.

Developmental Biology, International Twelfth Edition было впервые опубликовано на английском языке в 2020 г. Этот перевод опубликован по договоренности с Oxford University Press. ООО «Лаборатория знаний» несет полную ответственность за этот перевод оригинального произведения, и Oxford University Press не несет ответственности за любые ошибки, упущения, неточности или двусмысленности в этом переводе или за убытки, причиненные в связи с его использованием.

© 2020 Oxford University Press
© Лаборатория знаний, 2022

ISBN 978-5-00101-984-8

*Посвящается всем, кто непосредственно
участвовал в создании книги.*

*Спасибо моим родителям, Джозефу и Джеральдин Барреси,
что всегда ставите своих детей на первое место.*

*Моей семье — Хизер, Самуилу, Ионе, Луке и Матео —
эта книга была написана только благодаря вашему
непоколебимому пониманию, любви и поддержке.*

—M. J. F. B.

*Энн, Даниэлю, Сарре, Дэвиду и Наталье,
чья поддержка и юмор поддержали меня,
и Алине, которая родилась с момента последнего издания.*

—S. F. G.

Предисловие к русскому изданию

«Биология развития», написанная Скоттом Гилбертом, давно стала настольной книгой российских биологов. Несмотря на наличие учебников российских авторов, именно к ней обращаются студенты, аспиранты и молодые ученые самых различных биологических специальностей. Энциклопедическая широта, умелое изложение фундаментальных основ классической биологии во взаимосвязи с достижениями современных дисциплин делают эту книгу уникальной для формирования научного мировоззрения.

Сегодня биология развития — наиболее динамично развивающаяся область, открывающая все новые подходы и объекты. В пору говорить уже о вновь сформировавшихся направлениях биологии, которые наряду с *evo-devo* становятся самостоятельными научными дисциплинами. Клеточная эмбриология, биология стволовых клеток, в том числе и биология плюрипотентности, *eco-evo-devo* — вот не полный список дисциплин, в которых открываются завораживающие перспективы.

Казалось бы, что можно добавить в ставшее классическим издание «кирпича» С. Гилберта? Тем не менее новую книгу нельзя назвать несколько дополненным переизданием хорошо известной предыдущей. В издании, подготовленном С. Гилбертом совместно с М. Барреси, читатель встретит новые объяснения уже известных процессов, новые данные о молекулярных и клеточных механизмах развития. По-иному сформированы многие главы, описаны дополнительные объекты, несколько иначе расставлены акценты. Несмотря на привычную фундаментальность, в книге уделено значительное внимание инновационным подходам в биологии, даны отсылки к механизмам заболеваний, наследственных нарушений или к экологическим и общественным проблемам. Вероятно, это справедливая дань времени, требующего большей

прагматичности и технологичности даже от классических биологических дисциплин.

Следует отметить, что читателю русскоязычного варианта книги придется встретиться с рядом русскоязычных терминов, которые не эквивалентны англоязычным определениям. Экспериментальная эмбриология и биология развития имеют в России многолетнюю самобытную историю, поэтому ряд терминов давно сформирован и занял свое место в лексиконе ученых. Надеюсь, что это не составит большой проблемы, поскольку в тексте все термины подробно раскрыты, кроме того, в книге впервые представлен глоссарий, где мы постарались использовать и русскоязычные и англоязычные определения для объяснения важных понятий.

Среди авторов перевода — активно работающие ученые Института биологии развития имени Н. К. Кольцова РАН и кафедры эмбриологии Биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (благодарим И. Романову за участие в подготовке книги). Общим принципом перевода было уважительное отношение к исходному тексту, авторскому описанию и объяснению процессов и механизмов, даже если собственное мнение переводчика несколько отличалось от изложенной. Нам приходилось помнить, что в этом случае мы, прежде всего, переводчики и редакторы.

Итак, действительно новая книга «Биология развития» М. Барреси и С. Гилберта состоялась и на русском языке, а значит студенты, аспиранты, молодые и опытные исследователи и преподаватели получили источник актуальной информации о бурлящем океане под названием биология развития!

А. В. Васильев,
член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук

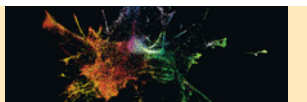
Содержание

Предисловие к русскому изданию	6	Новое в международном двенадцатом издании	18
		Развитие растений охватывает все	18
Предисловие: широкий взгляд на биологию развития	17	Модернизированная и расширенная глава по регенерации	18
		Обновления во всех главах	18
Вспомним междисциплинарные основы области	17	Новый, ориентированный на студентов, подход	19
		Благодарности	19

ЧАСТЬ I • Раннее развитие: дробление, гастрюляция и формирование осей 21



Возникновение тела и области: введение в биологию развития	21	Обзор раннего развития животных	34
		Способы дробления	34
«Как ты? Кто ты?». Сравнительная эмбриология и вопросы биологии развития	23	Гастрюляция: важнейшее событие в нашей жизни	36
Жизненный цикл	27	Первичные зародышевые листки и первые органы	37
Жизненный цикл животного	27	Постигая поведение клеток в эмбрионе	38
Жизненный цикл цветкового растения	28	Принципиальный подход к наблюдению развития	40
Пример 1: жизнь лягушки	28	Подход к проблеме: обнаружить, утратить, переместить	40
Гаметогенез и оплодотворение	29	Прямое наблюдение за живыми эмбрионами	41
Дробление и гастрюляция	29	Мечение красителями	41
Органогенез	31	Генетические метки	41
Метаморфоз и гаметогенез	31	Химеры с трансгенной ДНК	43
Пример 2: даже в жизни сорняков есть место цветам	32	Эволюционная эмбриология	45
Фазы репродукции и гаметофита	32	Понимание древа жизни позволяет увидеть взаимосвязи в развитии его представителей	47
Эмбриогенез и созревание семени	32	История развития наземных растений	52
Вегетативные фазы: от роста спорофита до определения соцветия	34	Медицинская эмбриология и тератология	56
		Генетические аномалии и синдромы	56
		Нарушения и тератогены	56
		Послесловие	57



Определение идентичности: механизмы разметки тела в развитии 59

Уровни коммитирования	59
Дифференцировка клеток	60
Созревание согласно траектории развития клетки	60
Автономная спецификация	61
Цитоплазматические детерминанты и автономная спецификация у оболочника	61
Условная спецификация	64
Синцитиальная спецификация	68
Положение определяют противонаправленные градиенты вдоль осей	68



Дифференциальная экспрессия генов: механизмы дифференцировки клеток 71

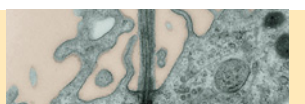
Определение дифференциальной экспрессии генов	71
Короткий курс по центральной догме	72
Доказательства геномной эквивалентности	73
Анатомия гена	75
Состав хроматина	75
Экзоны и интроны	76
Основные части гена эукариот	76
Продукт транскрипции и его процессинг	76
Некодирующие регуляторные элементы: включение, выключение, регулировка активности гена	77
Механизмы дифференциальной экспрессии генов: транскрипция	82
Эпигенетические модификации: настройка доступности генов	82
Транскрипционные факторы регулируют транскрипцию генов	85
Генная регуляторная сеть: определение отдельных клеток	90

Механизмы дифференциальной экспрессии генов: процессинг пре-мРНК	91
Создание семейств белков путем альтернативного сплайсинга пре-мРНК	91

Механизмы дифференциальной экспрессии генов: трансляция мРНК	93
Дифференциальная стабильность мРНК	93
мРНК, запасенные в ооцитах: избирательное ингибирование трансляции мРНК	93
Избирательность рибосом: избирательная активация трансляции мРНК	94
МикроРНК: специфическая регуляция трансляции и транскрипции мРНК	95
Контроль экспрессии РНК за счет локализации в цитоплазме	97

Механизмы дифференциальной экспрессии генов: посттрансляционные модификации белка	97
--	----

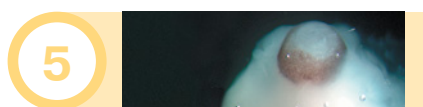
Послесловие	106
--------------------	-----



Межклеточная коммуникация: механизмы морфогенеза 109

Основы межклеточной коммуникации	110
Адгезия и сортировка: юкстакринные взаимодействия и физика морфогенеза	111
Дифференциальное сродство клеток	111
Термодинамическая модель взаимодействия клеток	113
Кадгерины и клеточная адгезия	114
Внеклеточный матрикс как источник сигналов для развития	116
Интегрины: рецепторы молекул внеклеточного матрикса	117
Эпителио-мезенхимный переход	118
Клеточная сигнализация	119
Индукция и компетенция	119
Паракринные факторы: молекулы-индукторы	123
Градиенты морфогенов	123
Каскады передачи сигнала: ответ на индукторы	125
Факторы роста фибробластов и тирозинкиназный сигнальный путь	125
FGF и сигнальный путь JAK-STAT	126
Семейство Hedgehog	127
Семейство Wnt	131

Суперсемейство TGF β	135	Клетки внутренней клеточной массы в эмбрионе мыши	158
Другие паракринные факторы	137		
Клеточная биология паракринной сигнализации	140	Ниши стволовых клеток у взрослых животных	159
Локальные выросты мембраны как источник сигналов	140	Стволовые клетки стимулируют развитие половых клеток в яичнике <i>Drosophila</i>	159
Юкстакринная сигнализация в определении идентичности клеток	145	Постнатальная ниша стволовых клеток в вентрикулярно-субвентрикулярной зоне	160
Сигнальный путь Notch: юстапозиция лигандов и рецепторов в установлении разметки тела	145	Нейронная ниша стволовых клеток в В-СВЗ	163
Координация паракринной и юкстакринной сигнализации: индукция вульвы у <i>C. elegans</i>	146	Постнатальная ниша стволовых клеток кишечника	166
		Самообновление клеток в крипте	166
		Стволовые клетки обеспечивают поддержание клеточного состава крови	168
		Гемопоэтическая ниша стволовых клеток	168
		Мезенхимные стволовые клетки: поддержание разнообразия тканей взрослого организма	171
		Регуляция развития МСК	172
Стволовые клетки: ниши стволовых клеток и их потенциал	151	Модели систем человека для изучения развития и болезней	172
		Плюрипотентные стволовые клетки в условиях лаборатории	173
Концепция стволовой клетки	152	Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки	176
Деление и самовоспроизведение	152	Органоиды: изучение органогенеза человека в культуральной чашке	179
Потенции определяют типы стволовых клеток	152	Стволовые клетки: надежда или шумиха?	182
Регуляция стволовых клеток	154		
Плюрипотентные клетки в эмбрионе	155		
Клетки меристемы у эмбриона <i>Arabidopsis thaliana</i>	156		



ЧАСТЬ II • Гаметогенез и оплодотворение: определение пола 185



Определение пола и гаметогенез	185	Вторичное определение пола у млекопитающих: гормональная регуляция полового фенотипа	193
Определение пола	185	Хромосомное определение пола у <i>Drosophila</i>	197
Хромосомное определение пола	186	Определение пола путем дозировки X-хромосомы	197
Способы определения пола у млекопитающих	186	Ген <i>Sex-lethal</i>	197
Гонадное определение пола у млекопитающих	187	<i>Doublesex</i> : ген переключения определения пола	199
		Определение пола в зависимости от внешних факторов	200
		Гаметогенез у животных	203

ППК млекопитающих: от половых валиков**до гонад** 203

Мейоз: переплетение жизненных циклов 204

Сперматогенез у млекопитающих 207

Оогенез у млекопитающих 211

Определение пола и гаметогенез у покрытосеменных растений 213**Определение пола** 213**Гаметогенез** 216

Пыльца 218

Семязачаток 218

**Оплодотворение: начало нового организма** 223**Структура гамет** 224

Сперматозоид 224

Яйцеклетка 226

Узнавание сперматозоида яйцеклеткой 228

Наружное оплодотворение у морского ежа 230

Привлечение сперматозоидов: действие на расстоянии 230

Акросомная реакция 230

Распознавание оболочки яйцеклетки 231

Слияние мембран сперматозоида и яйцеклетки 231

Предотвращение полиспермии: одна яйцеклетка, один сперматозоид 232

Активация метаболизма яйцеклетки морского ежа 236

Объединение генетического материала морских ежей 242

Внутреннее оплодотворение млекопитающих 243

Проникновение гамет в яйцевод: перемещение и капацитация 243

Вблизи ооцита: гиперактивация, направленное движение сперматозоидов, акросомная реакция 245

Распознавание *zona pellucida* 246

Слияние гамет и предотвращение полиспермии 246

Активация яйцеклетки млекопитающих 249

Слияние генетического материала 249

Оплодотворение у покрытосеменных растений 250

Опыление и не только: прогамная фаза 250

Прорастание пыльцы и удлинение пыльцевой трубки 250

Ориентирование пыльцевой трубки 251

Двойное оплодотворение 252

Послесловие 253**ЧАСТЬ III • Раннее развитие: дробление, гаструляция и формирование осей** 257**Улитки, цветы и нематоды: разные механизмы для схожих паттернов спецификации** 257**Напоминание об эволюционном контексте, в котором возникли стратегии регуляции раннего развития** 258

Двухслойные животные: стрекающие и гребневики 258

Трехслойные животные: первично- и вторичноротые 258

Что дальше? 260

Раннее развитие у улиток 260**Дробление эмбрионов улиток** 260

Материнская регуляция дробления улиток 262

Детерминация осей эмбриона улиток 268

Гаструляция у улиток 272**Нематода *C. elegans*** 272**Дробление и формирование осей у *C. elegans*** 274

Ротационное дробление яйца 275

Формирование передне-задней оси 276

Формирование дорсально-вентральной и право-левой осей 277

Контроль идентичности бластомеров 277

Гаструляция 66 клеток у *C. elegans* 279



Генетика спецификации осей у *Drosophila* **283**

Раннее развитие <i>Drosophila</i>	285
Оплодотворение	285
Дробление	286
Переход на средней бластуле	287
Гастрюляция	288

Генетические механизмы разметки тела *Drosophila* **290**

Сегментация и передне-задняя разметка тела **291**

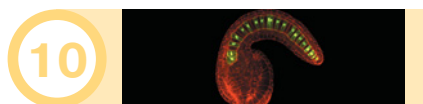
Материнские градиенты: регуляция полярности цитоплазмы ооцита	291
Передний организующий центр: градиенты Bicoid и Hunchback	296
Группа концевых генов	297
Обобщение ранней спецификации передне-задней оси у <i>Drosophila</i>	297

Гены сегментации	297
Сегменты и парасегменты	297
Гар-гены	299
Гены pair rule	299
Гены сегментной полярности	302

Гомеозисные селекторные гены **304**

Формирование дорсально-вентральной оси	306
Дорсально-вентральная разметка в ооците	306
Формирование дорсально-вентральной оси в эмбрионе	307

Оси и зачатки органов: модель в картезианских координатах **308**



Морские ежи и асцидии: вторичноротые беспозвоночные **313**

Раннее развитие морских ежей	313
Раннее дробление	314
Формирование бластулы	316
Карты презумптивных зачатков и детерминация бластомеров морского ежа	316

Генные регуляторные сети и спецификация скелетогенной мезенхимы	317
Спецификация вегетативных клеток	321

Гастрюляция морского ежа	321
Ингрессия скелетогенной мезенхимы	322
Инвагинация архентерона	326

Раннее развитие оболочников	327
Дробление	328
Карта презумптивных зачатков асцидий	328
Автономная и зависимая спецификация бластомеров оболочников	329



Амфибии и рыбы **333**

Раннее развитие амфибий **333**

Оплодотворение, кортикальная ротация и дробление **334**

Неравномерное радиальное голобластическое дробление	336
Переход к средней бластуле: подготовка к гастрюляции	336

Гастрюляция амфибий **337**

Эпибolia проспективной эктодермы	338
Вегетативная ротация и инвагинация бутылковидных клеток	338
Инволюция на губе бластопора	339
Конвергентное удлинение дорсальной мезодермы	343

Прогрессивная детерминация осей тела амфибий **345**

Спецификация зародышевых листков	345
Дорсально-вентральная и передне-задняя оси	346

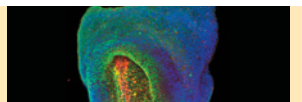
Работа Ганса Шлемана и Хильды Мангольд: первичная эмбриональная индукция **346**

Молекулярные механизмы формирования осей земноводных **348**

Как образуется организатор?	348
Функции организатора	353
Индукция нейроэктодермы и дорсальной мезодермы: ингибиторы BMP	354
Сохранение передачи сигналов BMP в ходе дорсально-вентральной разметки	356

Региональная специфичность нейронной индукции вдоль антерио-постериорной оси	358
Спецификация лево-правой оси	361
Раннее развитие <i>Danio rerio</i>	362
Дробление яйцеклетки <i>Danio rerio</i> : изучение процесса	365
Гастрюляция и формирование зародышевых листков	366
Развитие эпиболии	366
Интернализация гипобласта	368
Зародышевый щиток и нейральный киль	369
Процесс формирования дорсально-вентральной оси	371
Губа бластопора у рыб	371
Разделение сил Nodal и BMP во время детерминации оси	372
Формирование лево-правой оси	374

12

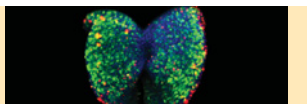


Птицы и млекопитающие 377

Раннее развитие птиц	379
Дробление у птиц	379
Гастрюляция у птиц	379
Спецификация осей и роль организатора в эмбрионах птиц	386
Формирование лево-правой асимметрии	387
Раннее развитие млекопитающих	388
Дробление у млекопитающих	389
Трофобласт или ВКМ? Первое решение, определяющее всю дальнейшую жизнь	391
Гастрюляция у млекопитающих	392
Формирование осей тела у млекопитающих	396
Близнецы	402
Послесловие	404

ЧАСТЬ IV • Строим из эктодермы: нервная система позвоночных и эпидермис 409

13



Формирование и разметка нервной трубки 409

Трансформация нервной пластинки в нервную трубку: рождение ЦНС	411
Первичная нейруляция	412
Вторичная нейруляция	421
Разметка центральной нервной системы	422
Передне-задняя ось	422
Дорсально-вентральная ось	422
Противостоящие морфогены	422
Все оси сходятся	426

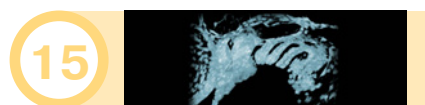
14



Рост мозга 429

Нейроанатомия развивающейся центральной нервной системы	429
Клетки развивающейся центральной нервной системы	430
Ткани развивающейся центральной нервной системы	430
Механизмы развития, регулирующие рост мозга	435
Поведение нейральных стволовых клеток во время деления	435
Нейрогенез: стройка снизу вверх (или изнутри наружу)	437
Глия как матрикс для мозжечка и неокортекса	438
Сигнальные механизмы, регулирующие развитие неокортекса	438

Развитие человеческого мозга	441
Фетальный рост нейронов после рождения	442
Холмы высятся на горизонте обучения	442
Гены роста мозга	444
Изменения в количестве транскриптов	445
Подростковый мозг: подключен и раскован	446



Клетки нервного гребня и специфичность аксонов **449**

Нервный гребень	449
Регионализация нервного гребня	451
Нервный гребень: мультипотентные стволовые клетки?	452
Спецификация клеток нервного гребня	454
Миграция клеток нервного гребня: из эпителия в мезенхиму и не только	455
Деламинация	455
Движущая сила контактного ингибирования	458
Коллективная миграция	459
Пути миграции клеток туловищного нервного гребня	460
Вентральный путь	461
Дорсально-латеральный путь	464
Головной нервный гребень	465
Модель «преследуй и беги»	468
Тянитолкай: хитроумное сотрудничество	468
Скелет черепа, образующийся из нервного гребня	470
Сердечный нервный гребень	471
Установление аксональных путей в нервной системе	471
Конус роста: водитель и двигатель аксона в поиске мишени	473
Rho действует на актиновые филаменты под влиянием сигнальных каскадов	473
Наведение аксона	475
Внутреннее программирование навигации моторных нейронов	476
Клеточная адгезия: механизм, чтобы удержаться на пути	477

Местные и дальнедействующие направляющие молекулы: дорожные знаки для зародыша	478
Паттерн избегания: эфрины и семафорины	478

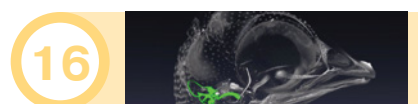
Как аксон пересекает дорогу?	480
...Нетрин	481
Slit и Robo	481

Путешествие аксонов ганглиозных клеток сетчатки **482**

Рост аксонов ганглиозных клеток к зрительному нерву	482
Рост аксонов ганглиозных клеток сетчатки сквозь зрительную хиазму	483

Выбор мишени: «Мы уже на месте?»	484
Хемотактические белки	485
Выбор мишени аксонами сетчатки: видеть — значит верить	485

Формирование синапса **488**



Эктодермальные плакоды и эпидермис **493**

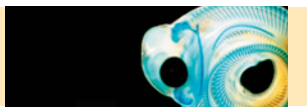
Черепные плакоды: чувства нашей головы	494
Индукция черепных плакод	495
Развитие слуховой и эпибранхиальной плакод: общий опыт	495
Морфогенез глаза позвоночных	501
Формирование глазного поля: образование сетчатки	502
Индукционный каскад хрусталик–сетчатка	504

Эпидермис и кожные придатки	505
Происхождение эпидермиса	507
Эктодермальные придатки	508
Сигнальные пути, в которые мы можем вонзить зубы	509
Стволовые клетки эктодермальных придатков	510

ЧАСТЬ V • Позднее развитие мезодермы и энтодермы: органогенез

515

17



Параксиальная мезодерма: сомиты и их производные 515

Клеточные типы сомита 518

Определение параксиальной мезодермы и клеточного развития вдоль передне-задней оси 519

Спецификация параксиальной мезодермы 519
 Пространственно-временная координатность экспрессии Нох-генов определяет идентичность структур туловища 521

Сомитогенез 524

Удлинение оси: каудальная зона предшественников и межтканевая адгезия 525
 Как формируется сомит: модель часов и волнового фронта 528
 Связь часов и волнового фронта с Нох-опосредованной осевой идентичностью и завершением сомитогенеза 533

Развитие склеротома 535

Формирование позвонков 537
 Формирование сухожилий: синдетом 540

Развитие дермомиотома 540

Детерминация центрального дермомиотома 542
 Детерминация миотома 543

18



Промежуточная мезодерма и мезодерма боковой пластинки: сердце, кровь и почки 547

Промежуточная мезодерма: почка 548

Спецификация промежуточной мезодермы: Pax2, Pax8 и Lim1 550

Реципрокные взаимодействия тканей развивающейся почки 551

Механизмы реципрокной индукции 552

Мезодерма боковой пластинки: сердце и кровеносная система 557

Развитие сердца 558

Миниатюрное сердце 558
 Формирование полей сердца 558
 Спецификация кардиогенной мезодермы 560
 Миграция клеток-предшественников сердца 560
 Начало дифференцировки клеток сердца 563
 Образование петли сердечной трубки 563

Формирование кровеносных сосудов 565

Васкулогенез: начало формирования кровеносных сосудов 565
 Ангиогенез: ветвление кровеносных сосудов и перестройка сосудистого русла 568

Кроветворение: стволовые клетки и долгоживущие клетки-предшественники 568

Места кроветворения 568
 Ниша ГСК в костном мозге 569

Послесловие 573

19



Развитие конечности тетрапод 575

Анатомия конечности 575

Почка конечности 576

Дифференцировка скелета конечности за счет Нох-генов 578

От проксимального к дистальному: Нох-гены в конечности 578

Как определить, какую конечность сформировать и где ее расположить 580

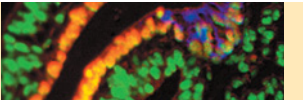
Спецификация полей конечности 580
 Индукция ранней почки конечности 582

Рост: формирование проксимально-дистальной оси конечности 587

Апикальный эктодермальный гребень 587
 Спецификация мезодермы конечности: детерминация проксимально-дистальной полярности 588
 Модель Тьюринга: реакционно-диффузионный механизм проксимально-дистального развития конечности 589

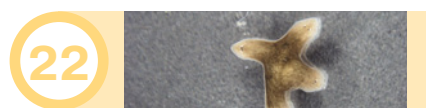
Спецификация передне-задней оси 593

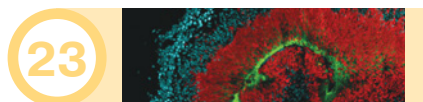
Sonic hedgehog определяет зону поляризующей активности 593

Спецификация идентичности пальцев под влиянием Sonic hedgehog	596	20 
Sonic hedgehog и FGF: еще одна петля положительной обратной связи	597	
Нох-гены как часть регуляторной сети, обеспечивающей спецификацию идентичности пальцев	597	
Формирование дорсально-вентральной оси	600	Энтодерма: трубки и органы для пищеварения и дыхания607
Гибель клеток и формирование пальцев и суставов	602	Глотка 609
Формирование аутоподия	602	Кишечная трубка и ее производные 611
Формирование суставов	602	Спецификация кишечной ткани613
		Придаточные органы: печень, поджелудочная железа и желчный пузырь614
Эволюция путем изменения сигнальных центров конечности	603	Дыхательная трубка 617
		Эпителио-мезенхимные взаимодействия и биомеханика ветвления в легких618

ЧАСТЬ VI • Постэмбриональное развитие 623

21 	Метаморфоз: гормональная реактивация развития	623	Регенерация: повторение эмбрионального развития?	641
Метаморфоз у амфибий	624	Эволюционный взгляд на регенерацию	643	
Морфологические изменения, связанные с метаморфозом амфибий	624	Механика регенерации	646	
Гормональный контроль метаморфоза амфибий	626	Регенерация у растений	647	
Программы развития с региональной специфичностью	628	Тотипотентный способ регенерации	647	
Метаморфоз у насекомых	629	Чудесные целительные силы меристемы растений	648	
Имагинальные диски	630	Регенерация всего тела у животных	652	
Гормональный контроль метаморфоза у насекомых	633	Гидра: регенерация за счет стволовых клеток, морфаллаксис и эпиморфоз	652	
Молекулярная биология активности 20-гидроэксидизона	635	Регенерация за счет стволовых клеток у плоских червей	655	
Детерминация имагинального диска крыла	635	Тканеспецифичная регенерация у животных	663	
		Саламандра: эпиморфная регенерация конечности	663	
		Определение клеток в регенерационной бластеме	664	
		Рыбка <i>Danio</i> : извлекаемая механизмы регенерации	667	
		Регенерация у млекопитающих	675	
Регенерация: развитие на службе восстановления	639	Компенсаторная регенерация печени млекопитающих	675	
Определение проблемы регенерации	640	Иглистые мыши: грань между регенерацией и образованием рубца	677	





Нормальное развитие

и патология:

врожденные дефекты, вещества,
нарушающие эндокринную систему,
и онкологические заболевания **681**

Роль случая **682**

Генетические ошибки в развитии человека **682**

Развитие и природа генетических синдромов
у человека **682**

Генетическая и фенотипическая
гетерогенность **683**

Тератогенез: атаки среды на развитие
животного **684**

Алкоголь как тератоген **685**

Ретиноевая кислота как тератоген **690**

Вещества, нарушающие эндокринную
систему: эмбриональные истоки заболеваний **691**

Диэтилстильбэстрол **692**

Бисфенол А **694**

Атразин: эндокринные нарушения,
вызываемые нарушением синтеза гормона **696**

Гидравлический разрыв пласта: новый
потенциальный источник веществ,
нарушающих эндокринную сферу **697**

Наследование нарушений развития **698**

Рак как заболевание, связанное с развитием **698**

Онкотерапия, основанная на факторах
развития **704**

Послесловие **705**



Развитие и эволюция:

механизмы биологии развития
в эволюционных изменениях **707**

Модель генетики развития в эволюционных
изменениях **708**

Предпосылки эволюции **708**

Структура развития в геноме **708**

Модульность: дивергенция через
диссоциацию **708**

Молекулярная экономия: дупликация генов
и дивергенция **710**

Механизмы эволюционных изменений **714**

Гетеротопия **714**

Гетерохрония **715**

Гетерометрия **716**

Гетеротипия **718**

Ограничения, накладываемые развитием
на эволюцию **719**

Физические ограничения **720**

Морфогенетические ограничения **720**

Плейотропные ограничения и избыточность **720**

Экологическая эволюционная биология
развития **720**

Пластичность — первая эволюция **721**

Генетическая ассимиляция в лабораторных
условиях **722**

Генетическая ассимиляция в природной
среде **723**

Отбираемые эпигенетические вариации **724**

Эволюция и симбиоз развития **726**

Эволюция многоклеточности **727**

Эволюция плацентарных млекопитающих **727**

Послесловие **727**

Приложение **731**

Краткое руководство по поиску
и пониманию научных статей по биологии
развития **731**

Исследование для исследования **731**

Поисковое исследование **731**

Навигация по базе данных PubMed **733**

Получение PDF-файла статьи **733**

Определение анатомии исследовательской
работы **733**

Глоссарий **735**

Указатель **791**

Рецензенты 12-го издания **800**

Предисловие: широкий взгляд на биологию развития

Говоря о биологии, иногда полезно «сесть султаном среди лун Сатурна» (по выражению Германа Мелвилла) — уйти от деталей и широко взглянуть на вещи вокруг. Хорошо бы, например, получить представление о биологии развития извне, а не изнутри дисциплины.

Вспомним междисциплинарные основы области

История говорит нам, что биология развития является междисциплинарной областью и лежит в основе биологии. Действительно, еще до того, как стали употреблять слово «биология», живой мир характеризовали как часть мира, которой свойственно развиваться. Организаторы первой встречи Общества роста в 1939 г., предшественника Общества биологии развития, утверждали, что развитие необходимо изучать путем объединения идей множества дисциплин, в том числе генетики, эндокринологии, биохимии, физиологии, эмбриологии, цитологии, биофизики, математики и даже философии. Биология развития должна была стать чем-то большим, чем эмбриология. Она тоже включала исследование стволовых клеток, которые, как было уже известно, производят кровь во взрослом организме, и регенерацию, которая, как было установлено, является повторной активацией процессов развития и имеет решающее значение для заживления повреждений у позвоночных и бесполого размножения гидры, плоских червей и многих других беспозвоночных. Первые статьи, опубликованные в журнале *Developmental Biology*, были посвящены эмбриологии, регенерации и стволовым клеткам, а также различным способам их изучения.

В этом новом международном 12-м издании мы вернемся к некоторым из основополагающих идей междисциплинарной биологии развития, а именно к регенерации, морфомеханике, развитию растений и генетическому контролю развития.

Действительно, *регенерация* исторически является важной частью биологии развития, поскольку ее легко изучать. Экспериментальная биология родилась

в попытках натуралистов XVIII в. описать и изучить этот феномен. Эксперименты по регенерации, выполненные Трамбле на гидрах, Реомюром на ракообразных и Спалланцани на саламандрах, установили стандарт для проведения исследований в экспериментальной биологии и обсуждения результатов.

По прошествии более двух веков мы начинаем находить ответы на великие вопросы как эмбриологии, так и регенерации. Действительно, выводы одного поддерживают исследования другого. Скоро мы сможем изменить человеческое тело таким образом, чтобы позволить нашим собственным рукам, ногам, нервам и органам регенерировать. Отрезанные конечности смогут восстанавливаться, больные органы можно будет удалить и воспроизвести, а нервные клетки, пострадавшие от возрастных изменений, заболеваний или травм, снова смогут нормально функционировать. Эти изменения усугубляют этические проблемы, которым все еще оказывают недостаточно внимания. Но если мы хотим приобрести такие способности, мы должны сначала понять, как происходит регенерация у тех видов, которым она свойственна. Наши новые знания о роли паракринных и физических факторов в формировании эмбриональных органов, а также новые исследования стволовых клеток и их ниш привели в движение то, что Сьюзен Брайант назвала «ренессансом регенерации». Ренессанс буквально означает «возрождение», а регенерацию можно рассматривать как возвращение к эмбриональному состоянию.

Обратите внимание, что одним из первых разделов биологии развития была *биофизика*. И эта область тоже переживает ренессанс. Контакты и прочность связей между клетками, а также сопротивление растяжению субстратов клеток, как представляется, являются критичными для нормального развития. Физические силы необходимы для связывания сперматозоидов с яйцеклеткой, гаструляции, развития сердца, развития кишечника, разветвления эпителия почек и легких и даже развития опухолей. Физические силы могут определять развитие стволовых клеток в конкретном направлении и определять, какая часть тела будет левой, а какая — правой. Коленная чашечка нашего коленного сустава не формируется, пока мы не начнем оказывать на нее давление при

ходьбе. Во многих случаях физические силы могут управлять экспрессией генов. Лев Белоусов, пионер в этой области, назвал данные процессы «морфомеханикой развития».

Развитие растений — еще одна область, широко представленная в ранних программах биологии развития. Она имела много общего с регенерацией, поскольку «взрослые» растения могут восстанавливать целые части своего тела. Если в биологии животных изучение развития проходило отдельно от физиологии, то в биологии растений такое разделение не было очевидным. Более того, если в развитии многих животных зародышевая линия, дающая начало сперматозоидам или яйцеклеткам, обособляется рано, то у растений это не так. Такие сопоставления растений и животных присутствуют во всем тексте книги и служат для выделения фундаментальных процессов развития, общих у разных типов и даже царств жизни.

Но центром внимания биологии развития остаются гены. И чем больше мы узнаем о них, тем интереснее и сложнее оказывается их устройство. Новые достижения в «транскриптомике отдельных клеток» дали нам поразительную привилегию — мы можем следить за паттернами экспрессии генов отдельных клеток по мере их развития. Клетки индивидуума могут иметь одни и те же гены, но их разное положение в зародыше приводит к тому, что в разных клетках активны разные гены. Это некая симфония взаимоотношений, в которой каждая клетка обеспечивает контекст для других. Если развитие можно назвать представлением, то геном — это сценарий или партитура. Любой, кто ходил на концерты, знает, что группы по-разному исполняют одно и то же произведение и даже одна и та же группа по-разному исполняет одну и ту же песню два вечера подряд. Окружающая среда тоже имеет решающее значение — отсюда новый интерес к пластичности и симбиозу в развитии.

Биология развития приобрела новую роль в естествознании. Больше, чем любая другая биологическая наука, она демонстрирует критическую важность процессов, а не сущностей. В разных организмах одни и те же процессы могут осуществлять разные молекулы. «Это песня, а не певец», — говорят Дулиттл и Бут, и мы можем быть благодарны за то, что пути развития избыточны — если один механизм терпит неудачу, другой часто может взять на себя его функцию. Разделение сущности или процесса в биологии развития подобно дихотомии частиц или волн в физике. Это ситуация «и то и другое», а не «или/или». В 1908 г. шотландский физиолог Дж.С. Холдейн сказал: «В какой-то момент можно будет найти точку встречи между биологией и физикой, в этом нет никаких сомнений. Но мы мо-

жем с уверенностью предсказать, что если это место встречи будет найдено и одна из двух наук будет поглощена, то это будет не биология». Биология развития вполне может решить давние загадки физики.

Новое в международном двенадцатом издании

В данном томе мы попытались отследить удивительно полное выполнение биологией развития своих ранних обещаний. С этой целью книга претерпела свой собственный морфогенез.

Развитие растений охватывает все

В это издание мы поместили материал, посвященный процессам развития растений, в соответствующие главы. Вместо того чтобы выделить биологию развития растений в одну (и часто необязательную) главу, мы включили информацию о биологии растений в главы, посвященные клеточной спецификации, регуляции генов, клеточной коммуникации, производству гамет, оплодотворению, определению осей, формированию органов и регенерации.

Модернизированная и расширенная глава по регенерации

Мы расширили главу по регенерации и с гордостью можем сказать, что она не только уникально отражает захватывающие проблемы постэмбрионального развития, которые, по-видимому, решает регенерация, но и объясняет логическую основу для известных механизмов регенерации, обусловленных степенью регенеративной способности организма. Возможно, что эта глава станет отличным источником знаний для тех, кто заинтересован в изучении данной области.

Обновления во всех главах

Все главы обновлены, начиная с более широкой эволюционной перспективы вводной главы и заканчивая новым материалом о морфомеханике развития во время гастрюляции у дрозофилы и формирования легких млекопитающих. Особое внимание было уделено все более широкому использованию полногеномных, транскриптомных подходов, выводящих наше понимание дифференцировки клеток на новый уровень.

Новый, ориентированный на студентов, подход

С педагогической точки зрения полезно знать, как студенты изучают биологию развития — *точку зрения студентов*. На протяжении десятилетий такие учебники, как наш, обязаны были быть наиболее всеобъемлющими источниками знаний в соответствующей области. Несмотря на то что такая ответственность все еще сохраняется, в реальности студенты завалены огромным количеством изданий, претендующих на их внимание. Если студенту, изучающему биологию развития, когда-либо и требовался *путеводитель* по этой густой и разнообразной экосистеме текстов, онлайн-ресурсов и бесконечно растущего объема научной литературы, то именно сейчас. И новый международный том *Биологии развития* — именно такой путеводитель.

- *Сфокусированное и структурированное изложение.* С годами, по мере того как появлялись новые знания, рос и наш учебник. Он достиг такого размера, который сам по себе может не только вызвать перегрузку студентов, но и разрушить всякую возможность глубокого обучения. Информационная бомбардировка студентов никуда не денется; поэтому им нужен не только доступ к информации, но и четкое руководство, которое способствует переходу от основных идей к сложным механизмам и, наконец, к приглашению присоединиться к исследованиям в конкретной области. Мы сократили и реорганизовали содержание каждой главы, создав четкую структуру изложения, чтобы и преподавателю, и студенту было легче ориентироваться в растущем объеме и сложности биологии развития.

- *Инновационная педагогика: расширение возможностей студентов для самостоятельного обучения.* Первый материал, с которым студенты столкнутся в каждом разделе главы, представляет собой наиболее важную информацию. Мы ввели новый элемент под названием «РАЗВИВАЕМ ТЕМУ», который заостряет внимание на некоторых наиболее сложных, по нашему мнению, идей в этой области. Особенности предыдущих выпусков — учебные материалы, информация для размышлений, перспективы исследований и ссылки на литературу — остались и по-прежнему предоставляют студентам возможность сделать шаг для изучения литературы по биологии развития.

Благодаря новой организации текста профессора и студенты теперь могут полностью контролировать, какой уровень материала наиболее им подходит. Мы с гордостью представляем 12-е международное издание *Биологии развития*, поскольку оно по-прежнему обеспечивает прямой доступ ко всем уровням знаний, но без ущерба для качества обучения.

Благодарности

Во-первых, авторы благодарят друг друга за взаимное уважение и удовольствие, полученное от совместной работы. Майкл хотел бы, чтобы общество знало, что Скотт крайне благосклонно приветствует новые идеи и что его энтузиазм по созданию лучшего продукта не колебался ни разу. Скотт хотел бы, чтобы общество знало, что он в восторге от новых идей, которые Майкл привнес в книгу, и что приверженность Майкла обучению в бакалавриате не имеет себе равных.

Во-вторых, мы рады признать важность Мэри Стотт Тайлер для этой книги. Лауреат премии Виктора Гамбургера в области образования и автор *Fly Cycle*, *Differential Expressions*, *The Developmental Biology Vade Mecum*, и *Inquiry Biology*, Мэри была автором, редактором и куратором содержания международного 12-го издания, помогая нам решить «что включить, а что исключить». Поскольку мы добавили в книгу исследования растений и должны были удалить другие материалы, понимание Мэри и ее видение книги в целом были очень важны.

Если наука подобна воздушному шару, расширяющемуся в неизвестное, — и чем больше воздушный шар, тем больше точек соприкасается с неизвестным, — то биология развития связывается с поразительным числом неизвестных. Точность и охват 12-го издания во многом обусловлены работой многих экспертов-рецензентов, которые нашли время для уважительного официального и неформального общения на протяжении всего процесса (см. список). Организацию такого взаимодействия последовательно проводили Лорен Кэхиллэйн, Нина Родригес-Марти и Кэти Тункавиге — спасибо за то, что сделали эту важную часть. Международное 12-е издание уникально, поскольку включает информацию о биологии развития растений. Было множество рецензентов, которые поделились своим опытом в отдельных главах, спасибо всем! Особую благодарность, однако, выражаем Анне Эдлунд и Марте Ласковски за их обзоры, касающиеся растений. Они были очень терпеливы с нами, и вина за любые недоразумения лежит только на авторах.

Это издание связано также с радикальными изменениями, произошедшими во время публикации *Биологии развития*. С отставкой Энди Синауэра, Sinauer Associates стало изданием Oxford University Press. Подготовка нашей книги проходила в оба периода и застала смену менеджеров, арт-директоров и нашего давнего редактора. Мы благодарим Sinauer Associates и Oxford University Press за их огромные усилия по поддержанию книги в период метаморфоза. Хотелось бы особенно поблагодарить Дина Скаддера за то, что он взял

на себя управленческие задачи и позволил нам работать над новыми моделями научного образования в течение переходного периода. Более того, на полпути к выпуску этого издания Джейсон Ноу из Оксфорда стал нашим главным редактором. Такой переход и короткие сроки производства могут потрясти лучших редакторов, но Джейсон помог составить лучшие оптимальные планы, чтобы все было скорректировано. Искреннее спасибо за ваши усилия, Джейсон. Между тем в доме Синауэра выпускающие редакторы Лаура Грин и Кэтлин Эмерсон поделились своим опытом и совместными идеями, сделав нам ряд важных предложений. Спасибо, Лаура, за то, что делились с нами своим ценным опытом в области производства на протяжении всего процесса редактирования.

Успех каждого издания в равной степени зависит от качества дизайна и внешнего вида книги, мы искренне ценим команду Синауэра за работу, выполненную в области искусства и средств массовой информации. Медиакоманду возглавляла Сюзанна Картер и творчески поддерживал Питер Лейси. Искренняя благодарность вам обоим. Кроме того, мы признательны всей группе Dragonfly Media, которая продолжает делать большую работу, стараясь представить многие из оригинальных рисунков Майкла с высочайшей точностью. Мы хотели бы также поблагодарить Джоан Джемм, Бет Робердж и Аннет Рапиер за их превосходный дизайн, макет и выпуск этого издания. Одной из особенностей *Биологии раз-*

вития было использование правовых научных данных и изображений. Отдельная благодарность команде по обеспечению разрешений на их публикацию, Марку Сиддаллу, Трейси Мартон и Мишель Бекта. И конечно, новая книга может попасть в руки читателей только с помощью надежной и стратегически действующей команды по продажам. Большое спасибо Сьюзен МакГлю и всем продавцам в Оксфорде, которые сейчас помогают поддерживать распространение этого учебника.

Наконец, нужно признать, что, хотя Скотт счастливо ушел в отставку, Майкл все еще отрабатывает «хвосты», занимаясь преподаванием, исследованиями, назначениями в комитетах и т. д., в дополнение к своим семейным обязанностям. Он не смог бы выделить время и энергию для этого учебника, если бы не пользовался поддержкой своего учебного заведения и студентов. Спасибо, Смит Колледж, за то что вы продолжаете позволять Майклу свободно создавать и распространять свои веб-конференции, документальные фильмы и учебные пособия по развитию. Выражаем искреннюю благодарность студентам-исследователям Майкла, вынужденным терпеть своего главного исследователя, слишком увлеченного развитием всего сущего! Знайте, что ваше терпение, поддержка и понимание действительно способствовали выходу этой книги.

M. J. F. B.

S. F. G.

24 мая 2019 г.

Возникновение тела и области:

введение в биологию
развития

Неужели вы с этим растением
кузены?



Фотография: M. J. F. Barresi и Kathryn Lee, 2018.
Благодарим Dr. Robin Sleith за предоставление
харофитовых водорослей

Одно из принципиальных различий между вами и любым механизмом состоит в том, что от последнего не требуется функционировать еще до того, как он построен. Каждый многоклеточный организм должен работать даже когда он только формируется. Он *развивается*. В период времени от оплодотворения до рождения организм называют **эмбрионом** (рис. 1.1). Сама концепция эмбриона ошеломляет. Как эмбрион вы должны выстроить себя из единственной клетки. Вы должны дышать, еще не имея легких, усваивать пищу, не имея кишечника, строить кости, будучи мягкотелым, и организовывать упорядоченные нейронные цепи до того, как научитесь думать. Не должно вызывать удивления, что большинство челове-



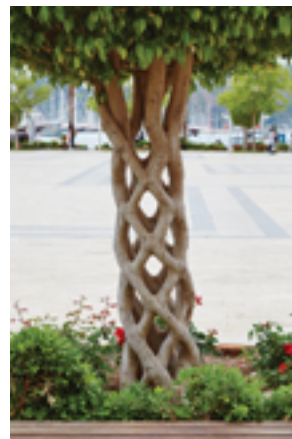
Рис. 1.1. Человеческий эмбрион на 9–10-й неделе развития

А



© Michael Nichols / National Geographic Creative

Б



© David Curtis / Фотобаза Alamy

В

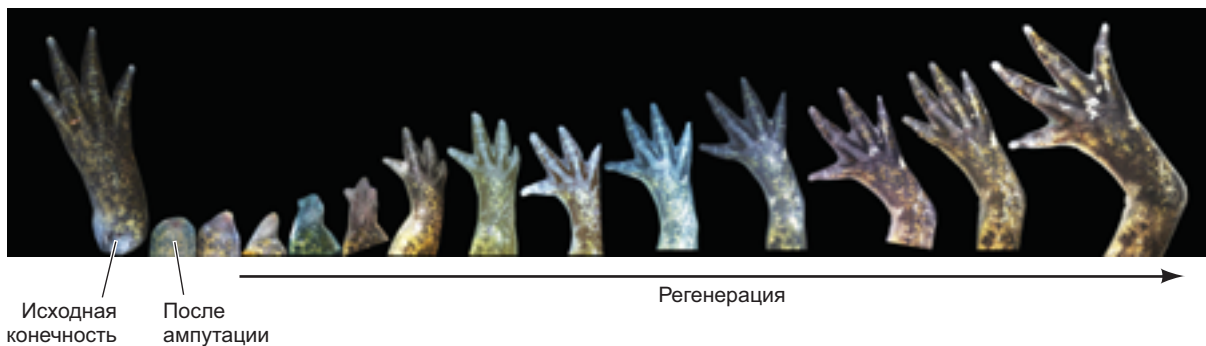
Лаборатория James
Monaghan / Северо-
Восточный Университет

Рис. 1.2. Необычайные возможности развития. **А.** Самое высокое дерево в мире было названо Гиперион. Это секвойя из национального парка Редвуд высотой более 114 м, что почти на 22 м выше Статуи свободы. Два исследователя, взбирающиеся на Гиперион на этом фото, выглядят как пауки, свисающие с его ветвей. **Б.** Аксель Эрландсон создал «дерево-корзину», срезав верхушки шести платанов и заставив их регенерирующие побеги срастись. Тем самым он продемонстрировал замечательную пластичность и регенеративную способность растений. **В.** Некоторые виды животных тоже проявляют выдающиеся регенерационные способности. Мексиканская саламандра может отрастить полноценную конечность после ампутации

ских эмбрионов погибают, не родившись. Вы выжили. Многоклеточные организмы не появляются полностью сформированными, а возникают путем относительно медленных прогрессивных изменений, которые мы называем **развитием**. В большинстве случаев развитие многоклеточного организма начинается с единственной клетки — яйцеклетки, завершившей процесс оплодотворения и с этого момента называемой **зиготой**. Зигота делится митозом, образуя все клетки тела.

Изучение развития животных традиционно называли эмбриологией, по названию фазы развития организма оплодотворения до рождения. Но развитие не заканчивается ни с рождением, ни даже во взрослом возрасте. Большинство организмов никогда не перестают развиваться. Каждый день у нас сменяется более грамма клеток кожи (старые клетки слущиваются в процессе движения), а костный мозг поддерживает развитие миллионов новых красных кровяных клеток каждую минуту нашей жизни. Растения проявляют потрясающую способность к постоянному росту в течение всей жизни; это явле-

ние известно как **неограниченный рост (рис. 1.2А)**. Клетки растений обладают даже способностью регенерировать целый организм (рис. 1.2Б). Некоторые животные могут воспроизводить поврежденные части (рис. 1.2В), и многие виды претерпевают **метаморфоз** (переход между двумя формами, например головастиком и лягушкой, гусеницей и бабочкой). На самом фундаментальном уровне биология развития стремится выяснить клеточные и молекулярные механизмы, которые управляют изменениями в клетках, тканях и органах — на промежутке времени, охватывающем всю жизнь, от оплодотворения до старения¹.

¹ Вокруг попыток точно очертить область биологии развития недавно развернулись дебаты (Pradeu et al., 2016). Некоторым кажется, что определить эту область невозможно, в то время как другие указывают, что наличие рамок может снизить отрицательные последствия, связанные с подразумеваемыми смыслами. Авторы данного учебника придерживаются включения множества различных точек зрения.

«Как ты? Кто ты?».

Сравнительная эмбриология и вопросы биологии развития

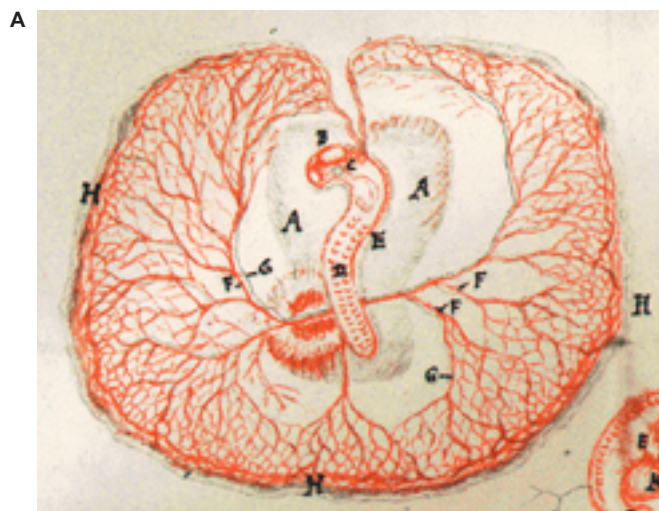
Аристотель, будучи первым известным эмбриологом, сказал, что удивление — источник знания, а развитие растений и животных, как ему было хорошо известно, — щедрый источник изумления. У оплодотворенного яйца нет сердца. Откуда же сердце появляется? Образуется ли оно одним и тем же способом и у насекомых, и у позвоночных? Многие вопросы биологии развития имеют сравнительный характер и берут начало из области эмбриологического наследования.

Первое известное исследование сравнительной анатомии развития было предпринято Аристотелем. В книге «О возникновении животных» (350 г. до н. э.) он отметил некоторые вариации на тему жизненного цикла: одни животные вылупляются из яйца (**яйцекладущие**, например птицы, лягушки и большинство беспозвоночных), другие рождаются (**живородящие**, например плацентарные млекопитающие), а некоторые, развиваясь в яйце, вылупляются из него еще в теле матери (**яйцеживородящие**, как некоторые рептилии и акулы). Аристотель идентифицировал также две основные закономерности деления клеток при образовании эмбриона: **голобластическое** дробление (при котором вся яйцеклетка разделяется на все более мелкие части) и **меробластическое** дробление (как у курицы, когда лишь часть яйцеклетки превратится в эмбрион, а все остальное — желток — служит питанием эмбриона). Вы когда-нибудь задавались вопросом, кто первым определил функции плаценты и пуповины человека? Снова Аристотель.

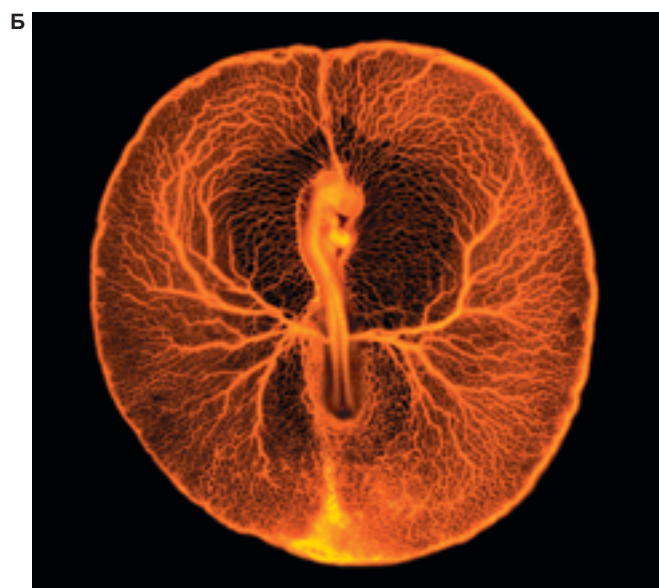
В следующие 2000 лет после Аристотеля эмбриология прогрессировала на удивление мало. Лишь в 1651 г. Уильям Гарвей заключил, что все животные — даже млекопитающие — происходят из яйца. *Ex ovo omnia* «Все из яйца» — гласил девиз на первой странице его книги «О возникновении живых существ», исключившей спонтанное зарождение животных из грязи или экскрементов¹. Гарвей также первым увидел бластодерму куриного яйца (небольшой участок яйца со свободной от желтка цитоплазмой, дающий начало эмбриону) и впервые заметил «островки» кроветворной ткани до образования сердца. Кроме того, Гарвей предположил, что амниотическая жидкость служит «амортизатором» для эмбриона.

Как и следовало ожидать, эмбриология по большей части оставалась в области спекуляций, пока

изобретение микроскопа не позволило проводить детальные наблюдения (**рис. 1.3**). Марчелло Мальпиги опубликовал первый отчет о микроскопическом наблюдении развития курицы в 1672 г. Именно в нем были впервые идентифицированы бороздка образующейся нервной трубки и дающие начало мышцам сомиты, а также первая система артерий и вен — к желтку и от него.



Из: M. Malpighi. 1672. *De Formatione Pulli In Ovo*. Лондон



С разрешения: Винсент Паске

Рис. 1.3. Анатомическое строение развивающегося цыпленка. **А.** Дорсальный вид (вид «сверху» на то, что впоследствии станет спиной) двухдневного куриного эмбриона, зарисованный Марчелло Мальпиги в 1672 г. **Б.** Дорсальный вид куриного эмбриона в конце второго дня развития, примерно через 45 мин после откладывания яйца. Сердце начинает биться на второй день. Сосудистая система эмбриона была проявлена введением флуоресцентных гранул в циркуляторное русло. Эффект трехмерности был получен путем наложения двух отдельных изображений

¹ Это заявление далось Гарвею нелегко, так как он знал, что оно противоречит взглядам почитаемого им Аристотеля. Аристотель утверждал, что менструальная жидкость образует вещество эмбриона, в то время как семя дает ему форму и оживляет.

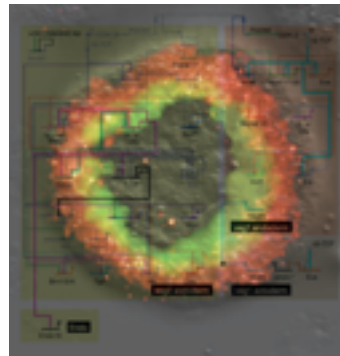
Развитие — это образование организованного тела из относительно гомогенного материала. Возникают вопросы: как телу всегда удастся образовывать голову над плечами? Почему сердце находится на левой стороне туловища? Как простая трубка образует сложные структуры головного и спинного мозга, порождающие мышление и движение? Почему мы не можем отрастить новые конечности, как саламандры? Как возникают межполовые анатомические различия?

Надо отдать дань сложности этих вопросов: наши ответы должны объяснять сеть причинно-следственных связей от гена до работающего органа. Сказать, что млекопитающие с двумя X-хромосомами обычно самки, а с XY-хромосомами — обычно самцы, недостаточно, чтобы объяснить определение пола биологу развития, который хочет знать, *как* генотип XX порождает самку и *как* генотип XY порождает самца. По аналогии, генетик мог бы спросить, как глобиновые гены передаются из поколения в поколения, а физиолог поинтересовался, в чем заключается функция их белков в организме. Но биолог развития спросит: как получается, что глобиновые гены экспрессируются только в красных кровяных клетках, и как они активируются только в определенные моменты развития. (Ответы мы до сих пор не знаем.) Область биологии определена характерным набором вопросов, подобно тому, как нас самих (по крайней мере, отчасти) определяют вопросы, которые мы задаем. Добро пожаловать в область важных и замечательных вопросов!

Развитие решает две основные задачи: во-первых, порождает клеточное разнообразие и упорядоченность в пределах отдельного организма; во-вторых, обеспечивает непрерывность жизни из поколения в поколение. Говоря другими словами, перед биологией развития стоят два фундаментальных вопроса: Как зигота дает начало взрослому телу? И как это тело производит новые тела? Огромные вопросы могут быть поделены на ряд следующих вопросов, разбираемых биологами развития.

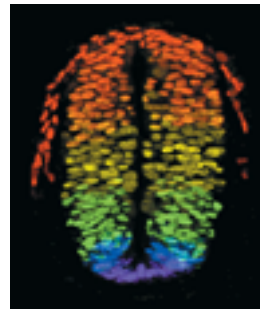
• **Вопрос дифференцировки.** Единственная клетка (оплодотворенное яйцо) дает начало сотням разных клеточных типов — мышечным и эпидермальным клеткам, нейронам, клеткам хрусталика, лимфоцитам и другим клеткам крови, жировым клеткам и т. д. Образование такого клеточного разнообразия называют **дифференцировкой**. Все клетки тела (за редкими исключениями) содержат один и тот же набор генов. Как же за счет идентичных генетических инструкций образуются различные клеточные типы? Как может единственное оплодотворенное яйцо давать начало такому множеству клеточных типов?¹

¹ В теле взрослого человека различают более 210 типов клеток, однако это число мало что говорит о том, сколько типов клеток образуется в человеческом теле на всем протяжении развития.



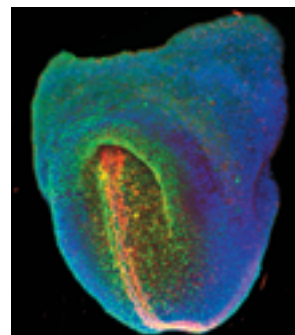
I. S. Peter и E. H. Davidson. 2011.
Nature 474: 635–639

• **Вопрос образования разметки тела.** От полос на теле зебры или *Danio rerio* до анатомических частей нашего тела — везде клетки и ткани стандартно располагаются в соответствии с узнаваемым планом. Голова спереди, хвост сзади, конечности по бокам от центрально расположенной нервной системы. Наше сердце расположено асимметрично, с левой стороны туловища. Признаки этой разметки можно обнаружить уже в начале эмбрионального развития. Какие процессы контролируют установление разметки типов тканей и клеток?



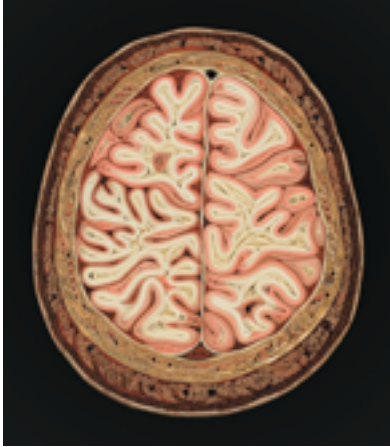
С разрешения:
E. M. Gorostiza

• **Вопрос морфогенеза.** Как клетки нашего тела организуются в работающие структуры? Дифференцированные клетки распределены не случайным образом: они организованы в сложные ткани и органы. В ходе развития клетки делятся, мигрируют и погибают; ткани складываются и разделяются. Головной и спинной мозг с их складчато-трубчатой формой начинался как пласты клеток. Пищеварительная система функционально связывает рот и анальное отверстие. Такое создание упорядоченной формы называют **морфогенезом**, и он включает в себя координацию роста, миграции и гибели клеток.



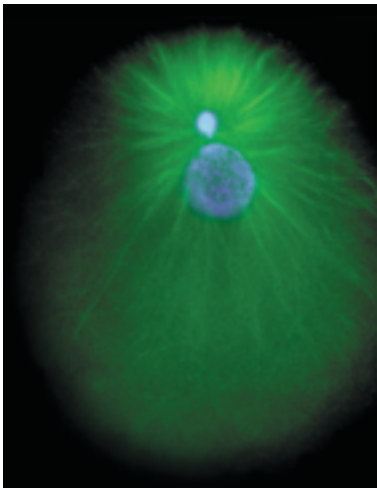
С разрешения:
I. Costello и E. Robertson

• **Вопрос роста.** Если бы каждая клетка в нашем лице прошла всего одно дополнительное деление, мы бы оказались устрашающе изуродованными. Если бы через лишний цикл деления прошла каждая клетка наших рук, мы бы завязывали шнурки, не нагибаясь. Как клетки узнают, когда перестать делиться? Наши руки с обеих сторон тела в основном оказываются одного и того же размера. Как деление клеток регулируется с такой точностью?



С разрешения:
Lisa Nilsson

• **Вопрос размножения.** Сперматозоид и яйцеклетка — высокоспециализированные клетки, способные передавать инструкции по созданию организма из одного поколения в другое. Как выделяются половые клетки и что за инструкции в ядре и цитоплазме позволяют им образовывать потомков?



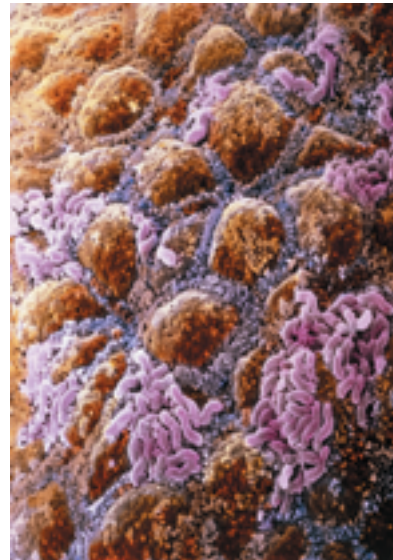
С обложки выпуска, содержащего J. Holy и G. Schatten. 1991. *Dev Biol* 147 (2), с разрешения авторов

• **Вопрос регенерации.** Некоторые организмы способны регенерировать каждую часть своего тела. Определенные саламандры регенерируют глаза и конечности, и многие рептилии регенерируют хвосты. В то время как млекопитающие в целом не блещут регенерационными способностями, в наших телах есть **стволовые клетки**, способные образовывать новые структуры даже у взрослых. Как стволовые клетки сохраняют эту способность и можем ли мы использовать ее для излечения заболеваний?



С разрешения: Junji Morokuma и Michael Levin

• **Вопрос интеграции с окружающей средой.** Развитие многих (вероятно, всех) организмов подвержено влиянию сигналов из среды, окружающей эмбрион или личинку. К примеру, у многих видов черепах пол зависит от температуры, в которой развивался эмбрион, будучи в яйце. У некоторых насекомых образование половой системы зависит от бактерий, переносящихся в яйце. Определенные химические вещества из окружающей среды могут нарушать нормальное развитие, вызывая уродства у взрослых. Как развитие организма интегрируется в более масштабный контекст его среды обитания?



© P.M. Motta & F. Carpino/Univ. "La Sapienza"/Science Source

• **Вопрос эволюции.** Эволюция включает наследуемые изменения развития. Говоря, что предки сегодняшних лошадей с одним пальцем были пятипальными, мы подразумеваем, что на протяжении многих поколений предков лошади происходили изменения в развитии хряща и мышц эмбриона. Как изменения развития порождают новую форму тела? Какие наследуемые изменения возможны с учетом ограничений, накладываемых необходимостью выживания организма на протяжении всего развития?



С разрешения: R. R. Behringer

Вопросы, задаваемые биологами развития, становятся принципиальными в молекулярной биологии, физиологии, клеточной биологии, генетике, анатомии, исследовании рака, нейробиологии, иммунологии, экологии и эволюционной биологии. Каждая из этих дисциплин имеет корни, уходящие в биологию развития. И все же, в отличие от своих научных «потомков», которые могут «обрастать» все новыми группами ограниченных парадигм, биология развития остается плюрипотентной. Недавно было даже высказано мнение, что биология развития является «стволовой клеткой биологических дисциплин» (Gilbert, 2017).

ВЫБИРАЯ ОРГАНИЗМ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВОПРОСА: МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ

Для ответа на вопросы, задаваемые биологами развития, исследователи нуждаются в податливом экспериментальном организме. Что делает организм «хорошей моделью» для решения конкретных вопросов? Так же как топор и пила подходят для близких, но все-таки разных задач, отдельные модельные системы среди животных дают исследователям разные преимущества. Некоторые из общих соображений по выбору хорошей модельной системы представлены ниже.

Размер. С точки зрения практики особенно важно учитывать размер взрослой особи. Легко ли разместить значительное число размножающихся взрослых особей в выделенной для этого лабораторной инфраструктуре? К примеру, для размещения 50 мышей в клетках необходимо гораздо больше места и затрат, чем для размещения 50 мух во флаконе.

Время генерации. Сколько времени требуется организму, чтобы пройти жизненный цикл от эмбриона до половозрелой взрослой особи? Кроме того, сколько длится эмбриональный период? Жизненный цикл круглого червя *Caenorhabditis elegans* в целом занимает 3 дня, в то время как у *Danio* «от яйца до яйца» проходит примерно 3 месяца. Однако ранний эмбриогенез *Danio* длится всего 24 ч.

Доступность эмбрионов. Чтобы изучать эмбриологию, исследователи должны иметь возможность видеть сам эмбрион и работать с ним. Доступность эмбрионов у отдельных видов различается. Одни рассеяны в воде и легко могут быть собраны, другие развиваются в непрозрачной оболочке, например птичьим яйце или даже в теле матери (в матке) в случае млекопитающих.

Возможность генетического исследования. Еще с работ Менделя на горохе биологи развития стремились идентифицировать генетическую основу всех процессов развития, от эмбриологии до патологии. Хотя вся жизнь основана на комбинации и использовании четырех азотистых оснований, у каждого вида свой геном. Различны и размеры генома, и его организация, и содержание, что может влиять на степень возможного генетического вмешательства. К примеру, исследователи, изучающие регенерацию мексиканской саламандры, вынуждены работать с самым большим геномом из когда-либо прочтенных.

Тип организма и его филогенетическое положение. В идеале поиск ответа на вопрос исследования должен приводить к выбору моделей развития. Если исследователи заинтересованы в замечательном явлении метаморфоза, они, очевидно, ограничены в выборе немногими модельными системами, проявляющими такие трансформации, например плодовой мушкой и лягушкой. Если они изучают развитие человека, то могут использовать одного из млекопитающих (мышь) или культуру человеческих клеток. Если их вопросы сфокусированы на расшифровке изменений развития, движущих эволюцию, они могут выбирать виды, занимающие информативное филогенетическое положение, такие как харофитовые водоросли, близкие к истокам многоклеточных наземных растений.

Простота экспериментальных манипуляций. Последнее, но не по значимости, соображение — насколько данный организм подходит для экспериментов, необходимых для ответа на заданный вопрос. Например, в силу длительных и значительных вложений в развитие модельных систем плодовой мушки и мыши существует множество мощных молекулярно-генетических инструментов для манипулирования функциями генов и белков в ходе эмбрионального развития этих организмов. Аналогичным образом, доступность обширного массива информации по генетике и развитию небольшого представителя семейства капустных *Arabidopsis thaliana* сделала его широко используемым модельным организмом для исследований цветковых растений.

ОБЫЧНЫЕ ПОДОЗРЕВАЕМЫЕ

Среди наиболее распространенных модельных систем, используемых в изучении эмбрионального развития, — цветковое растение (*Arabidopsis thali-*



Рис. 1.4. Некоторые из модельных систем, задействованных в изучении развития. Силуэты обозначают следующие модельные организмы (слева направо): *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Hydra vulgaris*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Gallus gallus*, *Mus musculus* и стволовые клетки *Homo sapiens* (изображена бластоциста с внутренней клеточной массой)

ана), морской еж (*Strongylocentrotus purpuratus*), асцидия (*Ciona intestinalis*), плодовая мушка (*Drosophila melanogaster*), круглый червь (*Caenorhabditis elegans*), рыбка данио (*Danio rerio*), гладкая шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis*), курица (*Gallus gallus*) и мышь (*Mus musculus*) (рис. 1.4). Однако этот короткий список обычных «подозреваемых» не вполне отражает разнообразие организмов, используемых при изучении развития. Например, к одним из лучших животных для изучения регенерации относятся гидра, плоские черви планарии, саламандра *Axolotl* и иглистые мыши. Многие из перечисленных модельных систем активно применяют для моделирования развития болезней человека. Кроме того, при изучении развития человека «в чашке» используют человеческие плюрипотентные стволовые клетки.

Развитие геномных и молекулярных подходов резко увеличило доступность нетрадиционных и немодельных организмов для исследования развития. Студентам, делающим сегодня первые шаги в области биологии развития, открываются захватывающие перспективы. Вам уже не придется ограничивать себя стандартными модельными системами, напротив, любой вид может стать модельным организмом в вашем исследовании.

Жизненный цикл

Своими первыми исследованиями модельных организмов описательная эмбриология принесла нам понимание разнообразия их жизненных циклов.

Жизненный цикл животного

Большинство животных от земляных червей и термитов до орлов и гончих проходят через схожие стадии развития: оплодотворение, дробление, гаструляцию, органогенез, вылупление (или рожде-

ние), метаморфоз и гаметогенез. Стадии развития от оплодотворения до вылупления (или рождения) собирательно называют **эмбриогенезом**.

- 1. Оплодотворение** включает слияние созревших половых клеток, сперматозоида и яйцеклетки, которые вместе называют **гаматами**. Слияние гамет стимулирует яйцеклетку к началу развития и запускает образование новой особи. Последующее слияние ядер гамет (мужского и женского **пронуклеусов**, каждый из которых содержит лишь половину набора хромосом, характерного для данного вида) обеспечивает эмбрион его **геномом**, т. е. собранием генов, направляющих развитие по тому же пути, что прошли родительские особи.
- 2. Дробление** состоит из серии митотических делений, непосредственно следующих за оплодотворением. В ходе дробления огромный объем цитоплазмы зиготы делится на множество более мелких клеток, называемых **бластомерами**. К концу дробления бластомеры обычно образуют сферу, известную как **бластула**¹.
- 3.** После того как темп митотических делений снижается, бластомеры совершают масштабные перемещения и меняют положение относительно друг друга. Эту последовательность обширных клеточных перестановок называют **гастроуляцией**, а об эмбрионе говорят, что он проходит стадию **гастротулы**. В результате гастроуляции эмбрион приобретает три **зародышевых листка (энтодерму, эктодерму и мезодерму)**, дальнейшие взаимодействия которых образуют все органы тела.

¹ В этой книге будет много терминов с корнем «бласт». Бластомер — клетка, образованная в раннем эмбрионе в ходе дробления. Бластула — эмбриональная стадия, состоящая из бластомеров; бластулу млекопитающих называют бластоцистой (см. гл. 12). Полость внутри бластулы — бластоцель. Бластулу без бластоцеля называют стереобластулой. Впячивание, с которого начинается гастроуляция, называют бластопором.

4. После установления зародышевых листков клетки взаимодействуют и перестраиваются для образования тканей и органов. Этот процесс называют **органогенезом**. Клетки зародышевых листков обмениваются химическими сигналами, что приводит к образованию конкретных органов в определенных местах. Некоторым клеткам приходится пройти долгий миграционный путь от места своего происхождения к конечному положению. Среди них — предшественники клеток крови и лимфы, пигментные клетки и гаметы (яйцеклетки и сперматозоиды).
5. У большинства видов вылупляющийся из яйца или рождающийся организм не является половозрелым. Напротив, чтобы превратиться в половозрелую взрослую особь, организм должен пройти метаморфоз. У большинства животных молодой организм называют **личинкой**, и он может очень сильно отличаться от взрослого внешне. У некоторых видов стадия личинки длится дольше всех и используется для питания или расселения. У таких видов взрослая форма — это краткая стадия, единственная задача которой заключается в размножении. Например, у взрослых мотыльков тутового шелкопряда отсутствует ротовой аппарат, и они не способны питаться; личинка должна есть достаточно, чтобы запастись энергией для выживания и спаривания взрослой формы. Действительно, большинство самок мотыльков спариваются сразу по вылуплении из куколки, а летают лишь однажды — чтобы спариться и отложить яйца. После этого они умирают.
6. У многих видов имеется группа клеток для производства следующего поколения (а не образования развивающегося эмбриона). Эти клетки — предшественники гамет. Гаметы и их предшественников вместе называют **клетками зародышевого пути**, а они обособливаются для функции размножения. Все прочие клетки тела называют **соматическими**. Разделение на соматические клетки (дающие начало телу особи) и клетки зародышевого пути (вносящие вклад в образование нового поколения) зачастую является первой дифференцировкой, имеющей место в развитии животного. Клетки зародышевого пути впоследствии мигрируют в гонады, где дифференцируются в гаметы. Развитие гамет, называемое **гаметогенезом**, обычно не завершается до полного физического созревания организма. По достижении зрелости гаметы могут высвободиться и участвовать в оплодотворении с образованием нового эмбриона. Взрослый организм впоследствии проходит через старение и умирает, зачастую поддерживая ранний эмбриогенез потомства содержащимися в нем питательными веществами, и уменьшая своим уходом конкуренцию. Таким образом, цикл жизни начинается снова.

Жизненный цикл цветкового растения

В отличие от животных в жизненном цикле цветковых растений (как и всех остальных наземных растений) присутствуют две сменяющие друг друга стадии: стадия диплоидного **спорофита** (с двойным набором хромосом), производящая споры и стадия гаплоидного **гаметофита** (с одинарным набором хромосом), производящая гаметы. Представляя прекрасную розу с цветком, листьями, стеблем и корнями, вы видите стадию зрелого спорофита; внутри цветка же кроются мужской и женский гаметофиты, производящие спермии и ооциты. В момент оплодотворения эти гаметы образуют эмбрионы нового поколения спорофитов, спрятанные под защитной оболочкой семени (см. рис. 1.8). При наступлении оптимальных условий среды эмбрионы начинают развиваться, запуская очередной жизненный цикл.

Во многих отношениях жизненный цикл цветковых растений схож с общей схемой жизненного цикла животных. В обоих случаях производятся мужские и женские гаметы; мужские гаметы должны достичь женских, а последующее оплодотворение запускает деление клетки митозом и развитие эмбриона. Как и у животных, эмбрион формирует три зародышевых листка, хотя они организуются не за счет движений гастрюляции. Кроме того, эмбрион, развивающийся в семени, после завершения эмбриогенеза обычно делает паузу перед последующим прорастанием и ростом. Дремлющий период может быть чрезвычайно долгим. В отличие от животных растения обладают неограниченным ростом. Продолжающийся рост обеспечивают области стволовых клеток, называемые меристемами. Они расположены в апикальном и базальном концах эмбриона и сохраняются у взрослого организма. (У взрослых животных тоже есть стволовые клетки, но они не используются для неограниченного роста.) Дифференцировка тканей в развивающемся растении, как и у животных, приводит к органогенезу, но у клеток растений снаружи от плазматической мембраны присутствует клеточная стенка, которой нет у животных. Клеточная стенка растений накладывает множество ограничений на механизмы развития, связанные с ростом и разметкой растения, среди которых ингибирование движения клеток, ограничение плоскости клеточного деления, необходимость уникальных способов перемещения молекул между клетками и более надежных регенеративных ответов для восстановления.

Пример 1: жизнь лягушки

Жизненные циклы всех животных представляют собой модификации общей схемы, описанной выше. Здесь мы разберем конкретный пример развития леопардовой лягушки *Rana pipiens* (рис. 1.5).

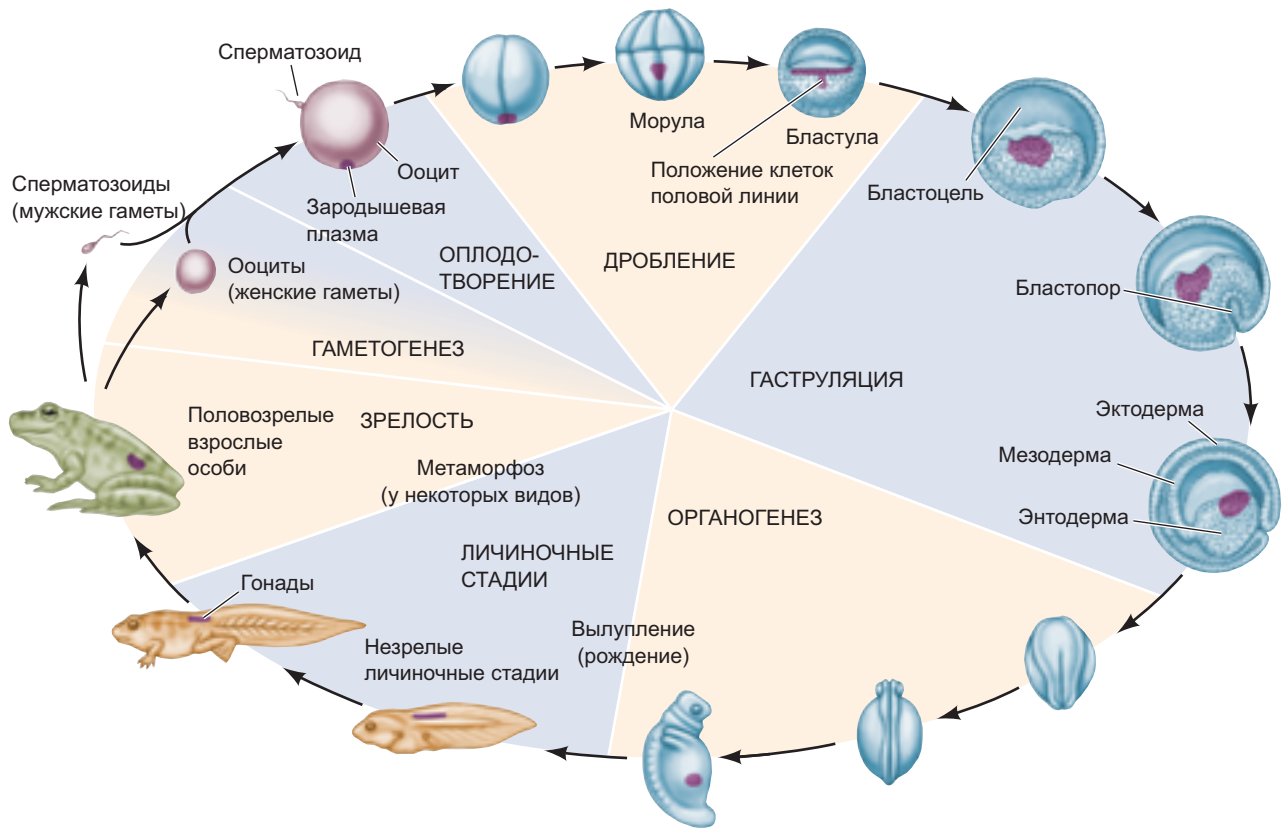


Рис. 1.5. Жизненный цикл леопардовой лягушки *Rana pipiens*. Стадии от оплодотворения до вылупления вместе называют эмбриогенезом. Область, отданная под производство клеток половой линии, выделена фиолетовым. Гаметогенез, завершающийся у половозрелой взрослой особи, начинается у вида в разное время. (Размеры разноцветных клиньев указаны произвольно и не отражают долю жизненного цикла, занимаемую одной стадией.)

Гаметогенез и оплодотворение

Конец одного жизненного цикла и начало следующего нередко тесно переплетены. Жизненные циклы часто зависят от факторов среды (головастики не выжили бы, вылупись они осенью, когда их источники пищи погибают), поэтому у большинства лягушек гаметогенез и оплодотворение — сезонные события. Сочетание фотопериода (длины светового дня) и температуры указывает гипофизу зрелой самки лягушки на наступление весны. Секретируемые гипофизом факторы вызывают созревание сперматозоидов и яйцеклеток.

У большинства видов лягушек оплодотворение наружное (рис. 1.6А). Самец обхватывает спинку самки и оплодотворяет ооциты по мере того, как она их выметывает (рис. 1.6Б). Некоторые виды откладывают икру на прудовую растительность, и тогда слизистая оболочка приклеивается к поверхности растений и закоривает на ней икринки. Икра других видов плавает в середине пруда без какой-либо опоры. Про жизненные циклы важно запомнить то, что они зависят от условий окружающей среды.

Оплодотворение позволяет убить двух зайцев: провести половой процесс (генетическую рекомбинацию) и воспроизведение (создание новой особи). Геномы гаплоидных мужского и женского пронуклеусов сливаются и рекомбинируют, образуя диплоидное ядро зиготы. Кроме того, проникновение сперматозоида способствует перемещению цитоплазмы внутри только что оплодотворенной икринки. Это смещение будет принципиально для установления трех осей тела лягушки: передне-задней (голова—хвост), дорсально-вентральной (спина—брюшко) и лево-правой. Важно также, что оплодотворение активирует молекулы, необходимые для начала дробления и гаструляции (Rugh, 1950).

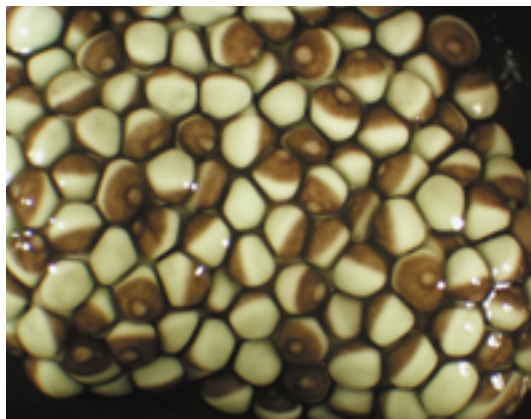
Дробление и гаструляция

Во время дробления общий объем икринки лягушки остается неизменным, но делится на десятки тысяч клеток (рис. 1.6В, Г). Гаструляция у лягушки начинается в точке на поверхности эмбриона примерно напротив точки вхождения сперматозоида с образования ямки, называемой **бластопором** (рис. 1.6Д).

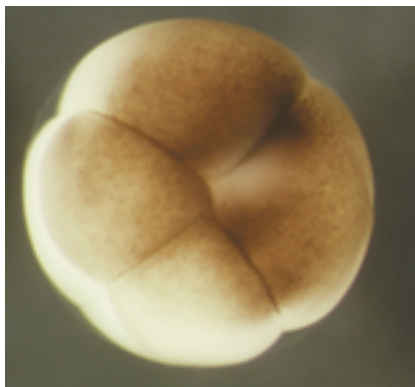
А



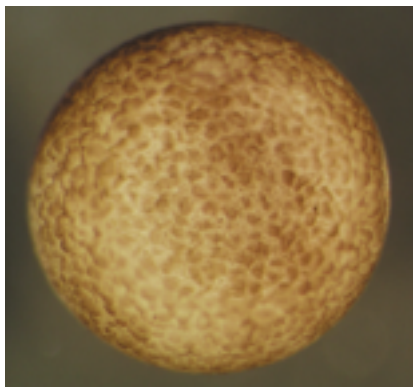
Б



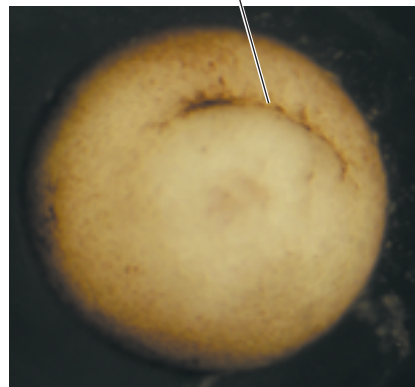
В



Г



Д

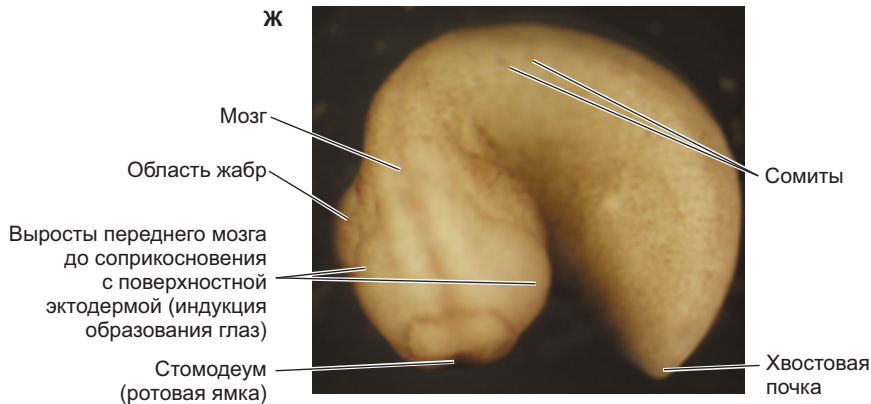


Е

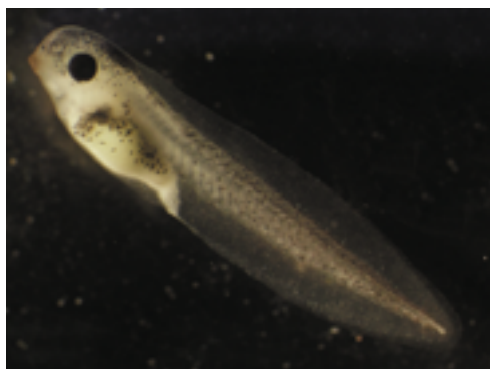


Открытая нервная трубка

Ж



З



С разрешения: Michael Danilchik и Kimberly Ray
(развитие яйца *Xenopus*)

Рис. 1.6. Раннее развитие лягушки *Xenopus laevis*. **А.** Спаривание лягушек происходит путем амplexуса — самец обхватывает брюшко самки и оплодотворяет икру по мере того, как она выметывается. **Б.** Свежая кладка яиц. Произошел поворот цитоплазмы, так что темный пигмент находится со стороны ядра. **В.** Восьмиклеточный эмбрион. **Г.** Поздняя бластула, состоящая из тысяч клеток. **Д.** Ранняя гастрюла с видом на дорсальную губу бластопора, через которую мигрируют мезодермальные и некоторые энтодермальные клетки. **Е.** Нервные валики нейрула сходятся на средней линии спины, образуя нервную трубку. **Ж.** Головастики до вылупления, на стадии индукции образования глаз выпячиваются переднего мозга. **З.** Зрелый головастик, уплывший от кладки и питающийся самостоятельно



Рис. 1.7. Метаморфоз лягушки. **А.** При сравнении взрослой лягушки-быка с головастиком становится очевидно, что произошли крупные изменения. Обратите особое внимание на различие в строении челюсти и конечностей. **Б.** Головастик до метаморфоза. **В.** Предметаморфный головастик, виден рост задних конечностей. **Г.** Начало метаморфного климакса с появлением передних конечностей. **Д, Е.** Стадии климакса

Бластопор, отмечающий будущую дорсальную сторону эмбриона, увеличивается, становясь кольцом. Клетки, мигрирующие через него внутрь эмбриона, становятся мезодермой и энтодермой; клетки, остающиеся снаружи от кольца, становятся эктодермой, и этот наружный слой расширяется, покрывая целый эмбрион. Таким образом, к концу гастрюляции эктодерма (предшественник эпидермиса, мозга и нервов) остается снаружи эмбриона, энтодерма (предшественник выстилки кишечника и дыхательных путей) оказывается в глубине эмбриона, а мезодерма (предшественник соединительной ткани, мышц, крови, сердца, скелета, гонад и почек) — между ними.

Органогенез

Органогенез лягушки начинается, когда клетки наиболее дорсальной части мезодермы уплотняются, образуя клеточный тяж под названием хорда¹. Клетки хорды выделяют химические сигналы, меняющие траекторию развития эктодермальных клеток, лежащих над ними. Клетки над хордой, вместо того чтобы образовать эпидермис, получают указание становиться клетками нервной системы. Они меняют форму и приподнимаются над окружностью тела (рис. 1.6Е).

¹ Хотя во взрослом состоянии хорда у позвоночных отсутствует, эта эмбриональная структура необходима для становления идентичности расположенных над ней эктодермальных клеток (см. гл. 13).

На этой стадии эмбрион называют **нейрулой**. Предшественники нервных клеток удлиняются, растягиваются и складываются внутрь эмбриона, образуя **нервную трубку**. Будущие эпидермальные клетки спины покрывают ее сверху.

Как только нервная трубка сформирована, она вместе с хордой вызывает изменения в соседних областях, и органогенез продолжается. Мезодермальная ткань, прилежащая к нервной трубке и хорде, сегментируется на **сомиты** — предшественники мышц спины, позвонков и дермы (внутренней части кожи) у лягушки. У эмбриона развиваются рот и анальное отверстие, а сам он удлинняется, приближаясь по строению к знакомому нам головастику (рис. 1.6Ж). Нейроны образуют связи с мышцами и другими нейронами, формируются жабры, и личинка готовится к выходу из икринки. Вылупившийся головастик будет питаться самостоятельно, как только истощатся запасы желтка, которыми его снабдила мать.

Метаморфоз и гаметогенез

Метаморфоз живущей исключительно в воде личинки во взрослую лягушку, способную жить на суше, — одна из наиболее поразительных трансформаций в биологии. Модифицируется практически каждый орган, и в результате имеет место разительное изменение формы (**рис. 1.7**). Задние и передние конечности, которые взрослая особь будет использо-

вать для передвижения, дифференцируются по мере рассасывания хвоста головастика. Хрящевой череп головастика замещается преимущественно костным черепом молодой лягушки. Роговые зубы, которыми головастики рвет прудовые растения, исчезают, и развиваются мышцы языка, необходимые для ловли мух взрослой лягушкой. В то же время длинный кишечник головастика — особенность травоядных — укорачивается, приходя в соответствие с хищным питанием взрослой особи. Жабры регрессируют, а легкие увеличиваются. Метаморфоз у амфибий запускают гормоны гипофиза головастика (о механизмах, с помощью которых тиреоидные гормоны обеспечивают эти изменения, см. в гл. 21). Скорость метаморфоза адаптирована к условиям окружающей среды. К примеру, в умеренных широтах метаморфоз *Rana* должен проходить до замерзания пруда зимой. Взрослая леопардовая лягушка может закопаться в грязь и пережить зиму; головастики не могут.

После завершения метаморфоза начинается развитие половых клеток (сперматозоидов и яйцеклеток). Гаметогенез может занимать длительное время. У *Rana pipiens* на созревание яйцеклеток в яичниках самки уходит 3 года. Для созревания сперматозоидов нужно меньше времени; самцы *Rana* зачастую фертильны вскоре после метаморфоза. Созревшими называют половые клетки, способные завершить **мейоз** — деление, уменьшающее ploidyность хромосомного набора для образования гаплоидных гамет. После прохождения мейоза ядра зрелых сперматозоидов и яйцеклеток могут сливаться при оплодотворении, восстанавливая диплоидный хромосомный набор и запуская процессы, ведущие к развитию и продолжению цикла жизни.

Пример 2: даже в жизни сорняков есть место цветам

Обсуждать развитие растений мы будем, фокусируясь в основном на исследованиях, проведенных на покрытосеменном растении *Arabidopsis thaliana*. Это небольшое цветковое растение, которое считают сорняком, отвечает всем критериям отличного лабораторного модельного организма. Его жизненный цикл длится всего 6 недель, технологии разведения рутинны, а геном относительно невелик и был многократно секвенирован и аннотирован. Разнообразие генетических, экологических и других экспериментальных подходов, доступных исследователям *A. thaliana*, обеспечило глубокое понимание механизмов, управляющих всеми аспектами жизненного цикла этого сосудистого растения. Важно, что в силу монофилетического происхождения (от единственного общего предка) наземных растений многое из того, что известно о развитии *A. thaliana*, применимо ко всем растениям (Koornneef and Meinke, 2010; Provart et al.,

2016). Однако цветущий сорняк — не платан и не кукуруза; механизмы эмбриогенеза у разных растений разнообразны, и некоторые из них мы опишем ниже.

Фазы репродукции и гаметофита

Взрослое цветковое (покрытосеменное растение) в фазе репродукции обладает полностью развитыми цветками с производящими пыльцу тычинками (мужскими половыми органами) и содержащими завязь пестиками (женскими половыми органами), в которых образуются соответственно гаплоидные спермии и ооциты (**рис. 1.8**). Гаметы вырабатываются в фазе гаметофита. Когда пыльца доставляет содержащийся в ней спермий к ооциту, происходит оплодотворение с образованием диплоидной зиготы (одноклеточного эмбриона (см. гл. 7; Huijser and Schmid, 2011)).

Эмбриогенез и созревание семени

В отличие от дробления у животных, которое препятствует значительному накоплению желтка в ооцитах, дробление семенных растений желтком не ограничено, так как питательные вещества для эмбриона запасены у них в окружающем его эндосперме семени (см. рис. 1.8; Palovaara et al., 2016). Чрезвычайно важно, что зигота делится, но делает это асимметрично. Первое деление зиготы дает маленькую (примерно одна треть от начального объема) апикальную клетку и гораздо более крупную базальную. Апикальная клетка далее дает начало собственно эмбриону, в то время как базальная становится связкой, служащей для поддержания эмбриона, в том числе обеспечивая его развитие в полости семени. Это первоначальное асимметричное деление задает первичную апикально-базальную ось эмбриона, в соответствии с которой побеги (стебли, листья, цветы) вырастут из самых апикальных клеток, а корни — из самых базальных. Точно выставленные поперечная и продольная плоскости клеточных делений продолжают построение зародыша через глобулярную, сердцевидную стадии, стадию торпеды и созревания (см. рис. 1.8). Поскольку клетки растений не способны мигрировать или двигаться, у них не происходит гастрюляционных перемещений, наблюдаемых в эмбриогенезе животных; различные морфологии этих стадий обусловлены манипуляцией плоскостью деления клеток и направленностью их роста.

Среди основных структур, формируемых в ходе эмбриогенеза *A. thaliana*, — меристемные ткани корня и стебля и эмбриональные листья, называемые **семядолями** (см. рис. 1.8). Кластер наиболее базальных клеток эмбриона обладает поведением ствольных клеток, и его называют **апикальной меристемой корня**, или АМК (root apical meristem, RAM). Клетки,

расположенные вдоль центральной оси эмбриона в его наиболее апикальной части, называют **апи-кальной меристемой побега**, или АМП (shoot apical meristem, SAM); они также обладают свойствами самообновления и дифференцировки (см. рис. 1.8). Кроме того, боковые оси, создающие сердцевидную морфологию, дают начало двум семядолям, обеспечивающим питательные вещества для поддержания развития на протяжении эмбриогенеза и прорастания семени (см. рис. 1.8).

Растения не обладают большим разнообразием клеточных типов, но в эмбрионе сразу же сегреги-

руются три характерных типа ткани: **покровные, опорные и сосудистые**. Покровные клетки образуют внешние слои эпидермиса растений. Опорные ткани дают начало основной массе внутренних структур растения. Клетки в самой середине эмбриона образуют сосудистые ткани: **ксилему**, представляющую собой каналы для доставки воды и питательных веществ вверх по растению, и **флоэму** — каналы для доставки сахаров, образованных в результате фотосинтеза, и других метаболитов, в основном от листьев к тем частям, которые поглощают их больше, чем производят.

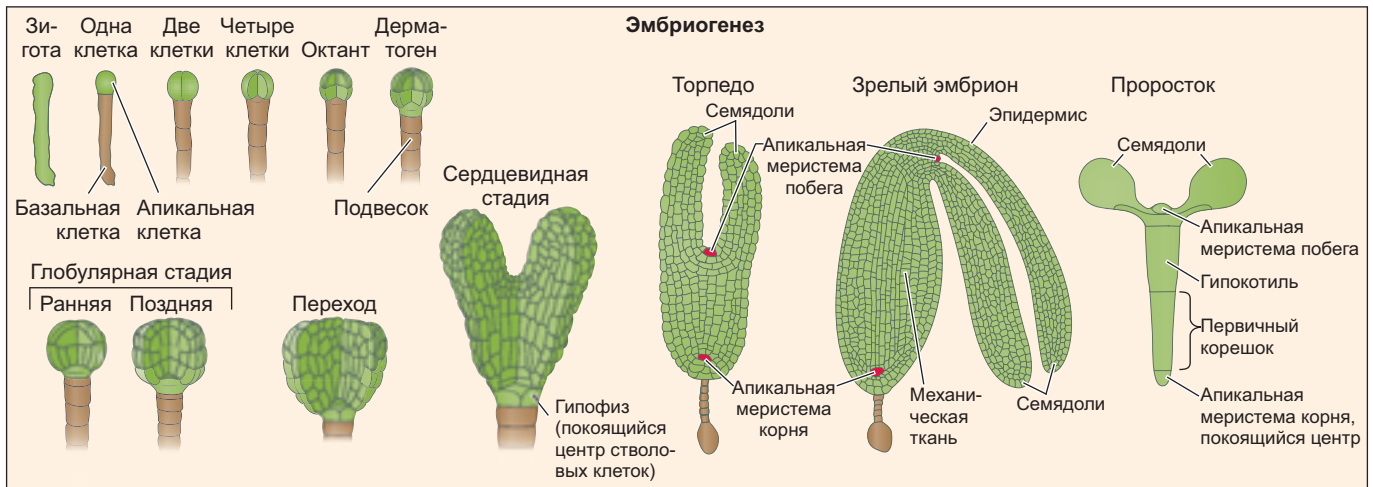
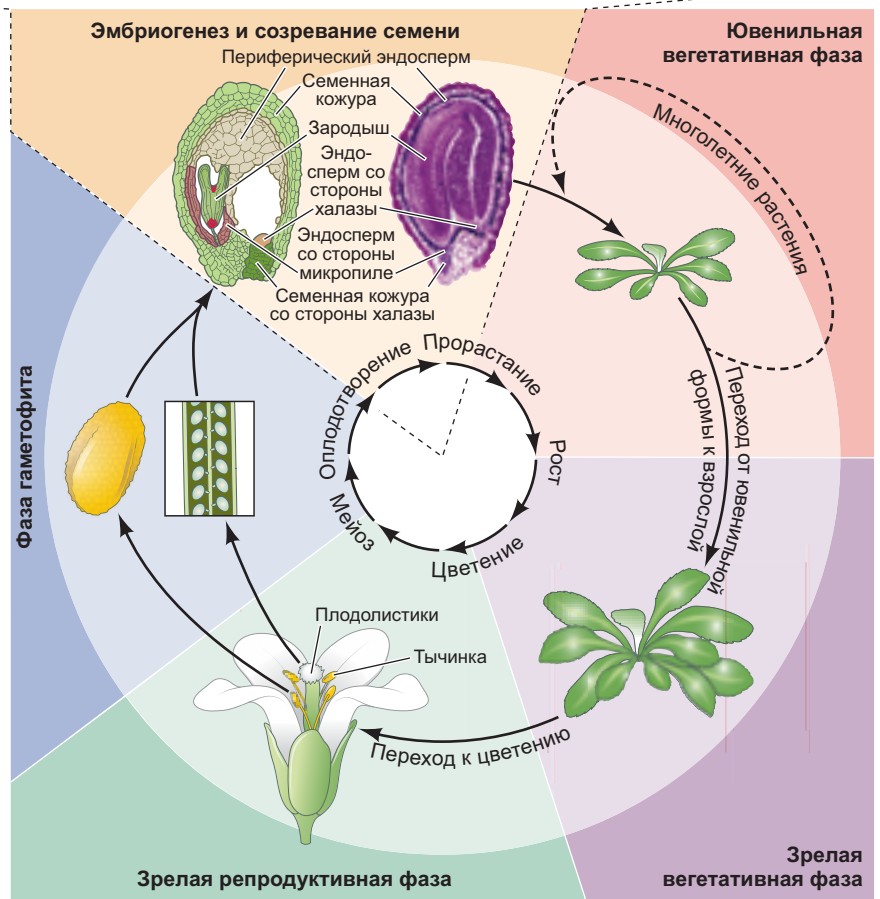


Рис. 1.8. Жизненный цикл *Arabidopsis thaliana*. В нижней части представлена каждая фаза чередования поколений, от зрелой репродуктивной фазы до фазы гаметофита, эмбриогенеза, созревания семени и вегетативных фаз в конце. В семени показаны две стадии эмбрионального развития (торпедо и созревания). В верхней части дано трехмерное изображение стадий эмбриогенеза от зиготы до зрелого эмбриона. Обратите внимание на апи-кальные меристемы побега и кроны, обозначенные на стадиях торпедо и зрелого эмбриона. (Верхняя часть из: J. Palovaara et al., 2016. *Annu Rev Cell Dev Biol* 32: 47–75; S. Yoshida et al. 2014. *Dev Cell* 29: 75–87; с разрешения Meryl Hashimoto, Mark Belmonte, Julie Pelletier и John Harada; нижняя часть по данным: P. Huijser and M. Schmid, 2011. *Development* 138: 4117–4129.)



Вегетативные фазы: от роста спорофита до определения соцветия

По завершении прорастания образовавшийся спорофит начинает расти и вступает в ювенильную вегетативную фазу, в которой в целом увеличиваются масса и общий размер растения до перехода во взрослую вегетативную фазу. Следом наступает взрослая репродуктивная фаза, во время которой происходит смена программы дифференцировки клеток АМП, в результате чего они начинают производить репродуктивные ткани вместо стеблей и листьев. Это означает, что на растении появляются цветки с вырабатывающими гаметы тычинками и пестиками. Как только растение завершает свое развитие, цикл жизни может повториться.

Обзор раннего развития животных

Способы дробления

Э. Б. Уилсон, один из пионеров, начавших применять принципы клеточной биологии в эмбриологии, в 1923 г. отметил: «Нам с нашим ограниченным разумением кажется нетрудным разделить ядро на равные части. Клетка, очевидно, придерживается совершенно иного мнения». Действительно, отдельные организмы осуществляют дробление совершенно разными способами, а механизмы этих различий остаются предметом изучения клеточной биологии и биологии развития. Клетки на стадии дробления называют бластомерами. У большинства видов животных (важное исключение — млекопитающие) как изначальная скорость деления клеток, так и расположение бластомеров относительно друг друга находятся под контролем белков и мРНК, запасенных в ооците, и лишь позднее скорость деления клеток и относительное положение бластомеров переходят под контроль собственного генома новообразованного организма (т. е. генома зиготы). На начальных этапах развития, когда ритмы дробления контролируются материнскими факторами, объем цитоплазмы не увеличивается и вместо этого цитоплазма зиготы разделяется на все более мелкие клетки — половинки, четвертинки, восьмые части и т. д. У большинства беспозвоночных и многих позвоночных дробление протекает очень быстро и, вероятно, представляет собой адаптацию для быстрого получения большого числа клеток и восстановления ядерно-цитоплазматического соотношения, характерного для соматических клеток. Эмбрион часто достигает этого за счет пропуска периодов клеточного цикла (фазы G_1 и G_2), когда происходит рост клетки. Икринка лягушки, например, способна поделиться на 37 000 клеток всего за 43 ч. Митоз в дробящихся

эмбрионах *Drosophila* происходит каждые 10 мин в течение более чем двух часов, и образуется около 50 000 клеток всего за 12 ч.

Способ дробления, присущий эмбрионам конкретного вида, обусловлен двумя основными параметрами: 1) количеством и распределением желтка в цитоплазме, определяющими возможное место деления и относительные размеры бластомеров; 2) факторами цитоплазмы ооцита, влияющими на угол наклона веретена митоза и время его образования.

В целом желток затрудняет деление. Когда один полюс яйца относительно свободен от желтка, клеточные деления протекают быстрее, чем на противоположном полюсе. Богатый желтком полюс называют **вегетативным**; на **анимальном полюсе** концентрация желтка относительно мала. Ядро зиготы часто смещено к анимальному полюсу. На **рис. 1.9** представлена классификация типов дробления и влияние желтка на симметрию и характер дробления. На одном конце спектра находятся ооциты некоторых морских ежей, млекопитающих и улиток. Ооциты содержат немного равномерно распределенного желтка и поэтому их называют **изолецитальными** (в пер. с греч. — равножелтковые). У этих видов дробление голобластическое (от греч. *holos* — полный), т. е. борозда дробления проходит через весь ооцит. Из-за малого количества желтка эти эмбрионы должны иметь источник питательных веществ. Большинство из них образует прожорливую личиночную форму, в то время как плацентарные млекопитающие получают питание от матери через плаценту.

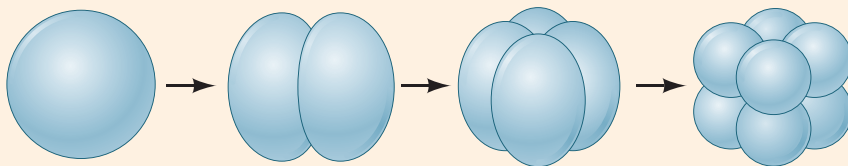
На другом конце спектра находятся ооциты насекомых, рыб, рептилий, птиц и яйцекладущих млекопитающих (однопроходных). Большая часть объема клетки у них занята желтком. У этих животных желтка должно быть достаточно, чтобы поддерживать их на протяжении всего эмбрионального развития. Зиготы, содержащие большие скопления желтка, проходят меробластическое дробление (от греч. *meros* — часть), в ходе которого делится лишь часть цитоплазмы. Борозда дробления не проникает в часть цитоплазмы с желтком, потому что его гранулы препятствуют образованию мембраны. У насекомых желток находится в центре яйца (т. е. они **центролецитальные**) и деление цитоплазмы проходит только в узком ободке по периферии клетки (т. е. **дробление поверхностное**). В ооцитах птиц и рыб лишь малая часть свободна от желтка (**телолецитальные ооциты**), и потому клеточные деления могут проходить только в пределах небольшого диска цитоплазмы, что приводит к **дискоидальному дроблению**. Тем не менее это только общие правила, и даже близкородственные виды в разных местах обитания могут в ходе эволюции развивать различные способы дробления.

Желток лишь один из факторов, влияющих на способ дробления у данного вида. На вызванные им ограничения накладываются и наследуемые осо-

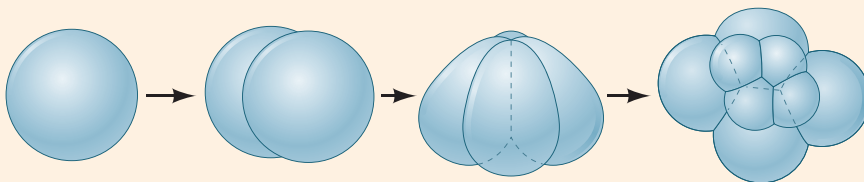
I. ГОЛОБЛАСТИЧЕСКОЕ (ПОЛНОЕ) ДРОБЛЕНИЕ**А Изолецитальная яйцеклетка**

(редкий, равномерно
распределенный желток)

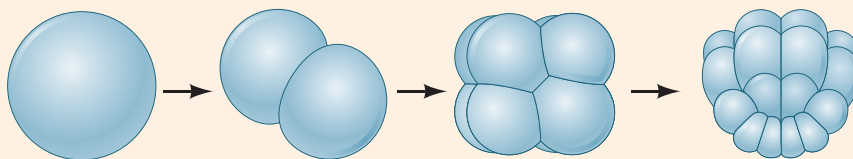
1. Радиальное дробление.
Иглокожие, ланцетник



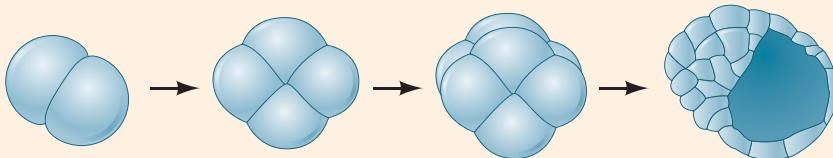
2. Спиральное дробление.
Аннелиды, моллюски,
плоские черви



3. Билатеральное дробление.
Оболочники

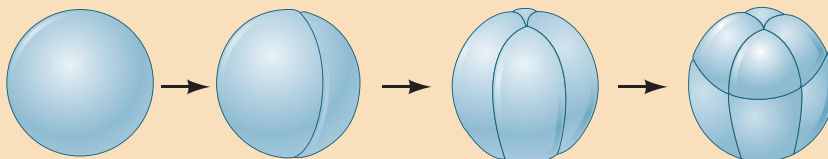


4. Ротационное дробление.
Млекопитающие, нематоды

**Б Мезолецитальная яйцеклетка**

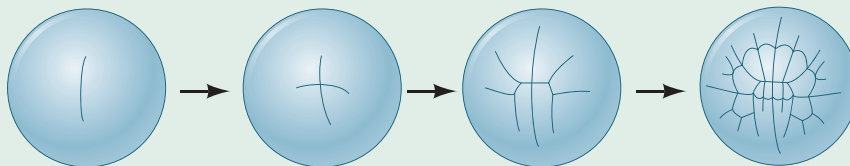
(умеренное отложение белка
на вегетативном полюсе)

1. Радиальное дробление
со смещением.
2. Амфибии

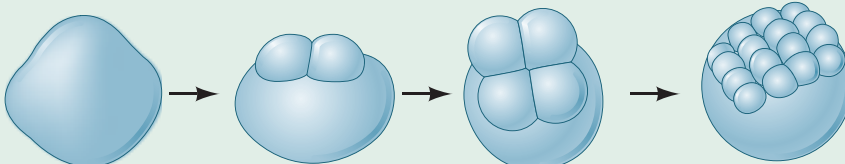
**II. МЕРОБЛАСТИЧЕСКОЕ (НЕПОЛНОЕ) ДРОБЛЕНИЕ****А Телолецитальная яйцеклетка**

(плотный желток, занимающий
большую часть клетки)

1. Билатеральное дробление.
Головоногие моллюски



2. Дискоидальное дробление.
Рыбы, рептилии, птицы

**Б Центролецитальная яйцеклетка**

(желток по центру яйца)

1. Поверхностное дробление.
2. Большинство насекомых

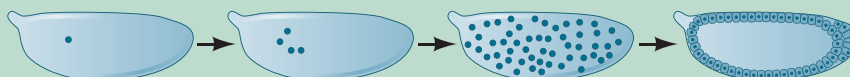


Рис. 1.9. Основные способы дробления

бенности деления клеток. Важность такого наследования легко заметить на примере изолецитальных ооцитов. В отсутствие значительного количества желтка имеет место голобластическое дробление. Описывают четыре его разновидности: *радиальное*, *спиральное*, *билатеральное* и *ротационное* голобластическое дробление (см. рис. 1.9).

Гаструляция: важнейшее событие в нашей жизни

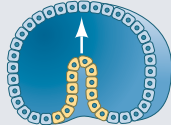
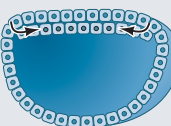
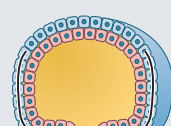
Согласно эмбриологу Льюису Вольперту, важнейшим моментом нашей жизни является не рождение, женитьба или смерть, а гаструляция. Это не преувеличение. Гаструляция — это то, что делает животных животными. (У животных она есть; у растений и грибов отсутствует.) В ходе гаструляции клетки бластулы получают новое положение и новых соседей, устанавливается многослойный план строения организма. Клетки, образующие энтодермальные и мезодермальные органы, переносятся внутрь

эмбриона, в то время как клетки, образующие эпидермис (наружный слой кожи) и нервную систему, распространяются по его внешней поверхности. Таким образом, три зародышевых листка — наружная эктодерма, внутренняя энтодерма и мезодерма между ними — впервые образуются в ходе гаструляции. Кроме того, устанавливается сценарий взаимодействия этих новообразованных тканей.

Гаструляция обычно осуществляется как некоторая комбинация из нескольких типов движений. Движения захватывают целый эмбрион, и миграция клеток в одной его части на стадии гаструляции должна быть точно скоординирована с другими движениями, происходящими в то же время. Хотя характер гаструляции сильно варьирует у представителей царства животных, она всегда представляет собой комбинацию из пяти базовых типов клеточных движений — **инвагинации**, **инволюции**, **ингрессии**, **деламинации** и **эпиболии** (табл. 1.1).

Помимо определения того, какие клетки окажутся в каком из зародышевых листков, для развития эмбриона требуется установление трех главных осей,

ТАБЛИЦА 1.1. Типы клеточных движений в ходе гаструляции¹

Тип движения	Описание	Иллюстрация	Пример
Инвагинация	Складывание внутрь пласта клеток (эпителия), напоминающее углубление от вдавливания на мягком резиновом мячике.		Энтодерма морского ежа
Инволюция	Движение внутрь расширяющегося внешнего слоя, в результате которого часть слоя распространяется по внутренней поверхности оставшихся снаружи клеток.		Мезодерма амфибий
Ингрессия	Миграция отдельных клеток с поверхности внутрь эмбриона. Эти клетки становятся мезенхимальными (т. е. несвязанными друг с другом) и мигрируют независимо.		Мезодерма морского ежа, нейробласты <i>Drosophila</i>
Деламинация	Разделение одного клеточного пласта на два более или менее параллельных. Хотя на клеточном уровне она напоминает ингрессию, в результате образуется новый (дополнительный) слой эпителиальных клеток.		Образование гипобласта у птиц и млекопитающих
Эпиболия	Движение эпителиальных пластов (обычно эктодермальных клеток), которые распространяются как единое целое (а не по отдельности), покрывая более глубокие слои эмбриона. Может происходить за счет деления клеток, изменения их формы или интеркаляции нескольких слоев клеток с уменьшением их числа; часто задействованы все три механизма		Образование эктодерм у морских ежей, оболочников и амфибий

¹ Гаструляция любого конкретного организма представляет собой комбинацию нескольких этих движений.

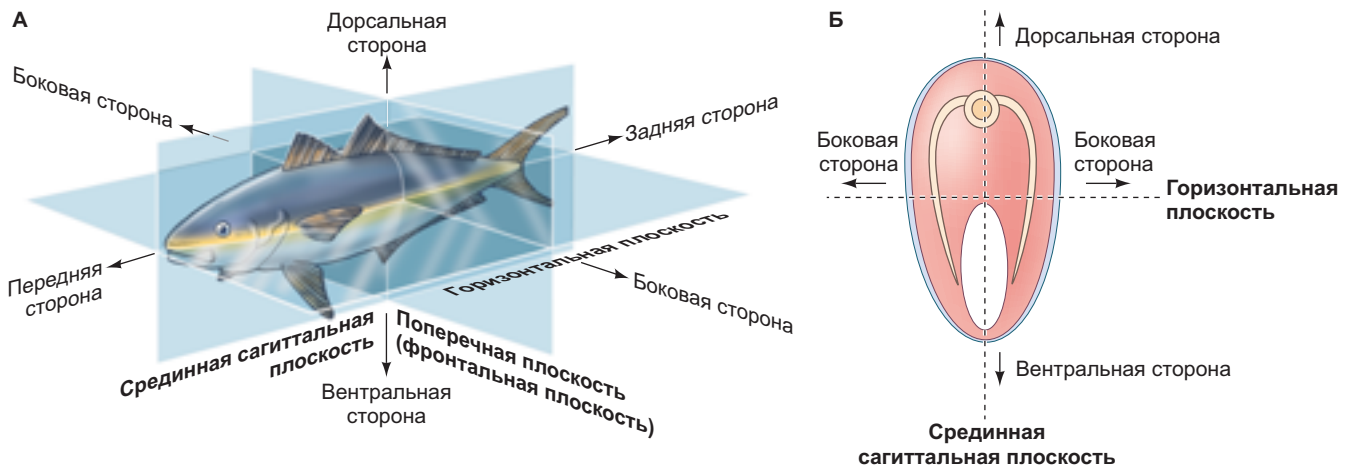


Рис. 1.10. Оси билатерально-симметричного животного. **А.** Только лишь одна срединная сагиттальная ось делит животное на одинаковые половины — левую и правую. **Б.** Поперечный срез вдоль передне-задней оси

закладающих основу тела: передне-задней, дорсовентральной и лево-правой (**рис. 1.10**). **Передне-задняя** (или **антерио-постериорная**, АП) ось — это линия, идущая от головы до хвоста (или от рта до ануса у тех организмов, которые головой и хвостом не обладают). **Дорсально-вентральная** ось (ДВ, или **спинно-брюшная**) — это линия, идущая от спины (*dorsum*) к животу (*ventrum*). **Лево-правая** ось отделяет боковые стороны тела друг от друга. Хотя тела людей, например, могут казаться симметричными, вспомните, что у большинства из нас сердце находится в левой половине тела, а печень — в правой. Каким-то образом эмбрион узнает, какие органы относятся к одной стороне тела, а какие — к другой.

Первичные зародышевые листки и первые органы

Конец преформизму — идее о том, что все органы взрослого представлены в миниатюре внутри сперматозоида или яйцеклетки — настал лишь в 1820 годах, когда сочетание новой техники окрашивания, усовершенствованные микроскопы и организационные реформы в немецких университетах породили революцию в описательной эмбриологии. Новые методики позволили микроскопистам запечатлеть эпигенез анатомических структур, организационные реформы обеспечили их доклады аудиторией, а студентов — возможностью продолжать исследования. В группе талантливых ученых, связавших свою работу с микроскопией, выделялись трое друзей, родившихся с интервалом в год, причем все трое по происхождению были из Прибалтики и учились в северной Германии. Работа Христиана Пандера, Генриха Ратке и Карла Эрнста фон Бэра превратила эмбриологию в специализированную область науки.

Изучая куриный эмбрион, Пандер открыл, что он состоит из зародышевых листков¹ — трех обособленных областей эмбриона, путем эпигенеза (т. е. образования *de novo*, или «с нуля») дающих начало дифференцированным клеточным типам и специализированным системам органов (**рис. 1.11**). Эти три слоя обнаружены в эмбрионах большинства типов животных:

- Эктодерма дает начало наружному слою эмбриона. Из нее происходит наружный слой кожи (эпидермис) и формируются нервная система и мозг.
- Энтодерма становится самым внутренним слоем эмбриона и дает начало эпителию пищеварительной трубки и связанных с ней органов (в т. ч. легких).
- Мезодерма оказывается зажатой между эктодермой и энтодермой. Она образует кровь, сердце, почки, гонады, кости, мышцы и соединительную ткань.

Пандер показал также, что зародышевые листки не образуют соответствующие им органы автономно (Pander, 1817). Скорее, каждый зародышевый листок «пока не настолько независим, чтобы было ясно, чем он является, и по-прежнему нуждается в помощи своих «сестер» на пути развития; поэтому, несмотря на то что им уже предначертан разный исход, все три листка сообща воздействуют друг на друга, пока каждый не достигнет определенного уровня». Пандер открыл взаимодействия тканей, которые мы сейчас называем индукцией. Ни одна ткань позвоночных не способна строить органы сама по себе; она обязательно взаимодействует с другими тканями (см. гл. 4).

¹ В английском языке зародышевые листки обозначают словами *germ layers*; *germ* является однокоренным с *germination* — прорастание и происходит от лат. *germen* — распускаться или давать почки. Названия трех зародышевых листков происходят от греч.: эктодерма — от *ektos* («снаружи») и *derma* («кожа»), мезодерма — от *mesos* («середина») и энтодерма — от *endon* («внутри»).

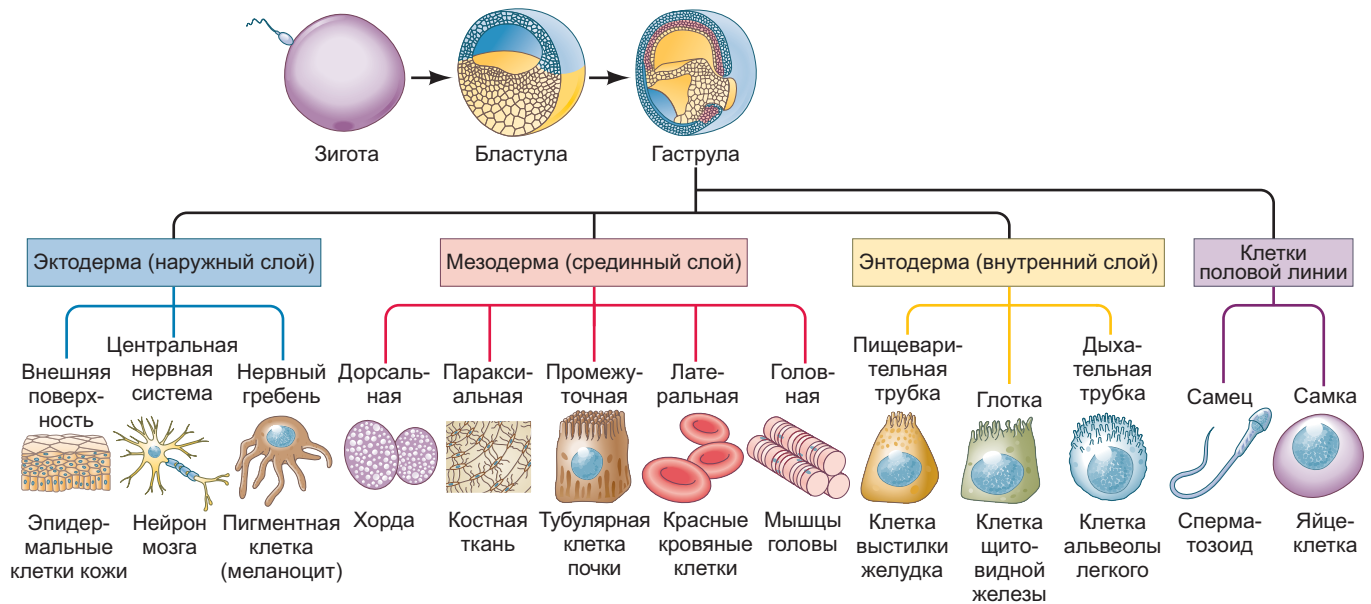


Рис. 1.11. Делящиеся клетки оплодотворенного яйца образуют три зародышевых листка. Каждый из листков дает начало множеству типов дифференцированных клеток (здесь показаны лишь некоторые представители) и различным системам органов. Клетки половой линии (предшественники яйцеклеток и сперматозоидов) отделяются на ранних этапах развития и потому не возникают из какого-либо одного зародышевого листка

Тем временем Ратке исследовал тонкости развития черепа позвоночных, выделительной и дыхательной систем, выявляя их последовательное усложнение. Он показал, что усложнение это идет по определенным траекториям в разных классах позвоночных. К примеру, Ратке первым идентифицировал **жаберные дуги** (рис. 1.12). Он показал, что из одних и тех же структур образуются опорные структуры жабр у рыб и челюсти с ушами (помимо прочего) у млекопитающих. Интересно, что жаберные дуги происходят из популяции мигрирующих стволовых клеток, называемых **клетками нервного гребня**. Поразительно, что клетки нервного гребня высвобождаются из дорсальной части нервной трубки и мигрируют в виде потоков клеток в различные периферические части головы и тела (см. рис. 1.12А), где дают начало таким разным производным, как хрящи и кости головы, сенсорные нейроны и глиальные клетки туловища, повсеместно присутствующим пигментным клеткам. В силу такого ярко выраженного поведения, характерного для стволовых клеток, клетки нервного гребня часто упрощенно называют четвертым зародышевым листком.

Постигая поведение клеток в эмбрионе

К концу 1800-х гг. было окончательно установлено, что клетка является базовой единицей анатомии и физиологии. Эмбриологи тоже начали проводить

свои исследования на уровне клеток. Однако в отличие от тех, кто изучал взрослые организмы, анатомы развития столкнулись с тем, что клетки в эмбрионе «не сидят на месте». Действительно, один из важнейших выводов, сделанных учеными, состоит в том, что эмбриональные клетки не остаются на одном месте и не сохраняют одну и ту же форму (Larsen and McLaughlin, 1987).

Эмбрион животного включает два основных типа клеток: **эпителиальные**, тесно связанные друг с другом в пласты или трубки; и **мезенхимные**, связанные друг с другом слабо или вовсе не связанные, способные действовать как независимые единицы. В рамках этих двух типов организации морфогенез осуществляется посредством ограниченного репертуара вариаций клеточных процессов:

- **Направление и число клеточных делений.** Представьте себе морды собак двух разных пород, например немецкой овчарки и пуделя. Их морды состоят из одних и тех же типов клеток, но число и ориентация клеточных делений различаются (Schoenebeck et al., 2012). А теперь представьте себе лапы немецкой овчарки рядом с лапами таксы. Клетки, образующие скелет у таксы, прошли меньше клеточных делений, чем у более высокой собаки. В качестве экстремального примера можно привести все растения. Их морфологическое разнообразие в высокой степени обусловлено контролем характера клеточных делений.

- **Изменение формы клеток.** Изменение формы клеток является принципиальной особенностью развития животных. Изменение формы эпителиаль-

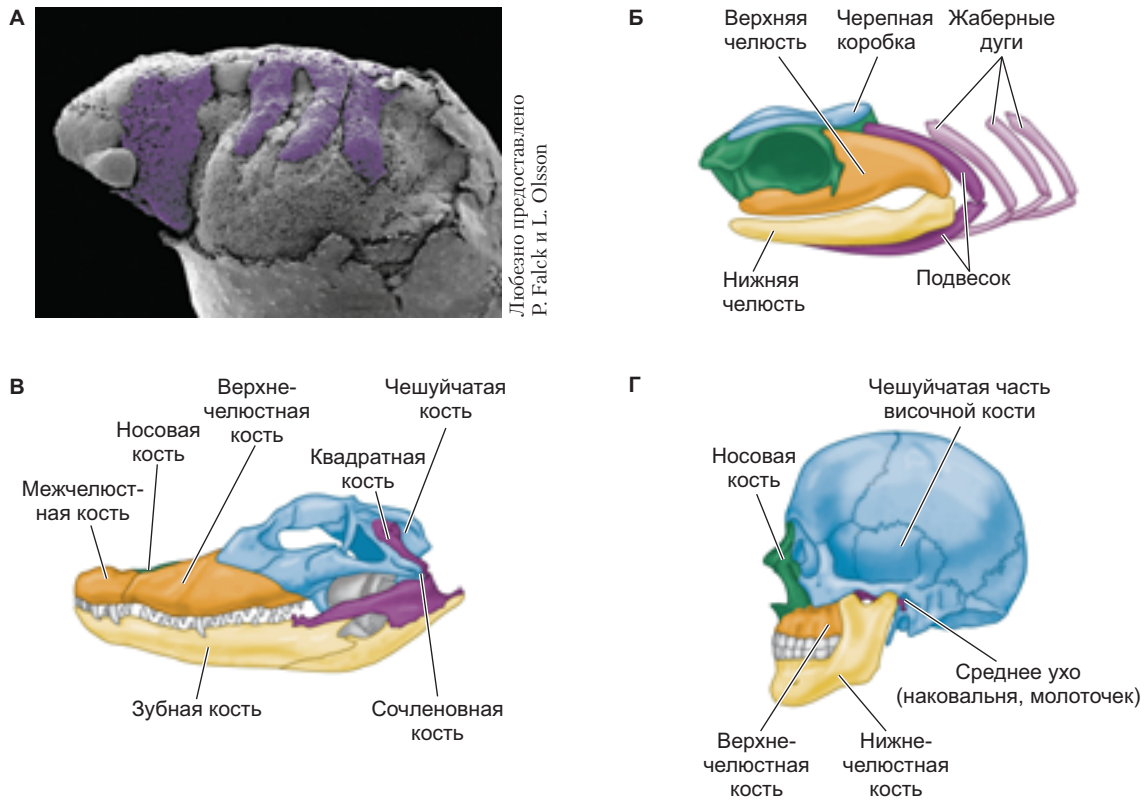


Рис. 1.12. Эволюция структур глоточных дуг в составе головы позвоночных. **А.** Глоточные дуги (называемые также висцеральными дугами) эмбриона мексиканской саламандры *Ambystoma mexicanum*. Поверхностную эктодерму сняли для лучшей визуализации дуг (выделены цветом) по мере их формирования из клеток нервного гребня, спускающихся вниз со средней линии. **Б.** У взрослых рыб клетки глоточных дуг образуют гиомандибулярные челюсти и жаберные дуги. **В.** У амфибий, птиц и рептилий (здесь показан крокодил) эти же самые клетки образуют квадратную кость верхней челюсти и сочленовную кость нижней челюсти. **Г.** У млекопитающих квадратная кость уходит вглубь черепа, образуя наковальню среднего уха. Сочленовная кость сохраняет контакт с квадратной, становясь молоточком среднего уха. Таким образом, клетки, поддерживавшие жабры у рыб, образуют кости среднего уха млекопитающих. (Рис. Б из: R. Zangerl and M. E. Williams, 1975. *Paleontology* 18: 333–341.)

ных клеток часто приводит к образованию трубок из слоев (как при формировании нервной трубки), а смена формы клеток при переходе от эпителиальных к мезенхимным крайне важна при миграции отдельных клеток из слоя эпителия (как в случае образования мышц). (Такой же переход от эпителия к мезенхиме способствует развитию рака, позволяя клеткам опухоли мигрировать и распространяться из нервной опухоли к новым местам). Хотелось бы прояснить, что у растений нет мезенхимных клеток, а следовательно, и присущих им вариантов клеточного поведения, например миграции.

- **Миграция клеток.** Клетки должны двигаться, чтобы занять соответствующее положение. К примеру, клетки половой линии мигрируют в развивающиеся гонады, а будущие клетки сердца встречаются в середине шеи позвоночных и далее мигрируют в левую часть груди.

- **Рост клеток.** Клетки могут менять размер. Это особенно заметно в случае половых клеток: спер-

матозоиды избавляются от большей части своей цитоплазмы и становятся меньше, в то время как развивающиеся яйцеклетки сохраняют и преумножают объем цитоплазмы, становясь, по клеточным меркам, огромными. Многие клетки претерпевают асимметричные деления, в результате которых получаются более крупная и более мелкая клетки иногда с совершенно различными траекториями развития. И вновь растения монополизировали этот клеточный механизм однонаправленного роста для удлинения клеток сосудистых тканей, ксилемы и флоэмы.

- **Клеточная гибель.** Смерть — важнейший этап жизни. Эмбриональные клетки, составляющие перепонки между пальцами на руках и ногах, умирают до нашего рождения. Как и клетки нашего хвоста. Отверстия наших рта, ануса и половых органов также образуются за счет **апоптоза** — программируемой гибели определенных клеток в определенное время в конкретном месте. Элементы сита, которые составляют главные каналы ксилемы в растениях, представляют

собой просто скелетные остатки клеточной стенки после целевого апоптоза.

- *Изменение состава клеточных мембран или выделяемых белков.* Клеточные мембраны и секретируемые продукты одних клеток влияют на поведение соседних. Так, внеклеточный матрикс, секретируемый одной группой клеток, позволяет соседним мигрировать. Внеклеточный матрикс, производимый клетками других типов, наоборот, будет останавливать миграцию той же группы клеток. Таким образом устанавливаются «пути и направляющие» для мигрирующих клеток.

Принципиальный подход к наблюдению развития

Подход к проблеме: обнаружить, утратить, переместить

Виктор Гамбургер однажды сказал: «Нашим настоящим учителем был и остается эмбрион, и, кстати, это единственный учитель, который всегда прав» (Holtfreter, 1968). Гамбургер был биологом развития, внесшим вклад в создание системы стадий развития куриного эмбриона, которой мы все пользуемся сегодня (стадии Гамбургера — Гамильтона, или HH), и это достижение было бы немыслимо без тщательных наблюдений и экспериментов с эмбрионами.

Как в мозге позвоночного развивается столь точная сеть связей? Как пестики, тычинки и лепестки цветка так безупречно организовываются в радиальную структуру? Влияют ли микроорганизмы, обитающие в кишечнике, на скорость деления и дифференцировку стволовых клеток его выстилки, и если да, может ли это привести к раку? Какова бы ни была тема (задача) исследования, биологи развития часто подходят к дизайну эксперимента с общеизвестной мантрой: обнаружить, утратить, переместить (Adams, 2003). Разумеется, это излишнее упрощение невероятного разнообразия способов, которыми ученые расшифровывали механизмы биологии развития, но оно полезно в качестве введения в область.

Обнаружить: изучая развитие, необходимо иметь возможность видеть объект исследования. Им может быть целый эмбрион, что в зависимости от вида представляет те или иные сложности. Сравните доступность эмбриона лягушки или рыбки *Danio*, развивающегося вне тела матери, с доступностью эмбриона мыши, развивающегося в матке, или эмбриона курицы, развивающегося в яйце. Кроме того, «возможность видеть» подразумевает наблюдение определенных тканей и даже отдель-

ных клеток в этих тканях, либо объекты еще более мелкого масштаба, например локализацию белков или транскриптов РНК. Достижения в области мечения и инновации в микроскопии позволяют ученым наблюдать за развитием все лучше, ведь в конце концов развитие — процесс, протекающий во времени. Тем не менее одно лишь наблюдение структур и морфогенетических событий обеспечивает ученых описаниями и сравнительной информацией о каком-либо процессе. А вот для определения причинно-следственных связей биологам развития необходимо манипулировать процессом.

Утратить и/или переместить: давайте обсудим потрясающее явление регенерации целой конечности после ампутации, наблюдаемое у некоторых животных, например мексиканских саламандр. Одни из первых структур, возникающих после ампутации, — **бластема** (небольшой бугорок из пролиферирующих клеток) и покрывающий рану эпидермис. Если бластеме после ампутации удалить (утрата), регенерации не произойдет. В то же время трансплантация (перемещение) бластемы в другое, необычное, место у саламандры — на спину или даже в глаз — дает фундаментально иное знание. В результате такой трансплантации из бластемы вырастает конечность — в необычном месте, но соответствующая по ориентации той стороне тела (левой или правой), на которой выросла. Да, на этих страницах вас ждут сумасшедшие примеры! В конце концов, развитие — забавное явление. Но мы отвлеклись. Эксперимент с «утратой» показывает, была ли утраченная сущность (ткань, клетка, ген и т. п.) *необходима* для определенного процесса, в то время как эксперимент с «перемещением» показывает, была ли эта сущность *достаточной*. В нашем примере бластема одновременно необходима (требуется) и достаточна для регенерации конечности. В случае утраты гомолога гена *Pax6* у мухи или мыши не развиваются глаза. Однако когда «мышинный» ген *Pax6* транскрибируется в ноге мухи..., на ней образуется глаз мухи (см. рис. 24.3В)! Безумие — но объяснимое, и мы объясним его в следующих главах.



Загадки развития

Проверьте себя: эксперимент какого типа провели Реверberi и Минганти: обнаружение, утрату или перемещение? И, предвосхищая этим вопросом тему главы 2, ответьте, что их результаты сообщают нам о желтых бластомерах?

Полностью см. в гл. 2. «Мышечный» фактор, отсутствующий в других бластомерах. Ответ на вопрос: утрату. Результаты указывают на то, что желтые бластомеры — единственные клетки, детерминированные к превращению в мышцу, и должны содержать какой-то «мышечный» фактор, отсутствующий в других бластомерах.

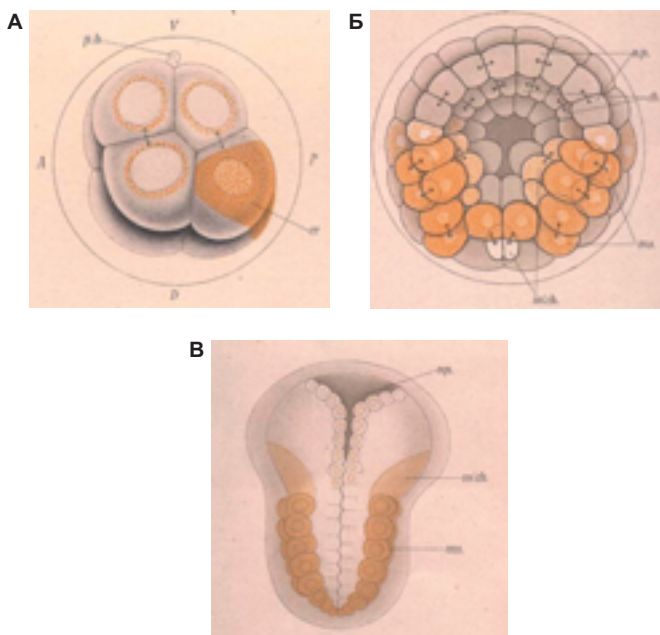


Рис. 1.13. Развитие отдельных клеток. Эдвин Конклин картировал пути развития первых клеток оболочника *Styela partita*, используя тот факт, что у эмбрионов этого вида многие из клеток можно идентифицировать по различиям цвета цитоплазмы. Желтая цитоплазма служит маркером клеток, которые сформируют мышцы туловища. **А.** На стадии восьми клеток два из восьми бластомеров содержат желтую цитоплазму. **Б.** На стадии ранней гаструлы видна желтая цитоплазма предшественников мускулатуры туловища. **В.** На ранней личиночной стадии видна желтая цитоплазма новообразованных мышц туловища. (Из: E. G. Conklin, 1905. *J Acad Nat Sci Phila* 13: 1–119.)

Прямое наблюдение за живыми эмбрионами

У некоторых эмбрионов относительно мало клеток, а цитоплазма их ранних бластомеров содержит пигменты разного цвета. В таких удачных случаях действительно можно просто напрямую наблюдать развитие через микроскоп и отслеживать потомков определенной клетки по мере образования органов. Так создается **карта презумптивных зачатков** — схема, «проецирующая» структуры личинки или взрослого на области эмбриона, из которых они происходят. Э. Г. Конклин терпеливо проделал эту работу, проследив судьбу каждой из ранних клеток оболочника *Styela partita* (рис. 1.13; Conklin, 1905). В его эмбрионе клетки, образующие мышцы, всегда желтые и происходят из одной и той же области цитоплазмы, находящейся в определенной паре бластомеров на стадии восьми клеток. Удаление этой пары бластомеров (которая, согласно карте судеб Конклина, должна дать мускулатуру хвоста) и в самом деле приводит к развитию личинки без

мышц хвоста, что подтверждает корректность карты Конклина (Reverberi and Minganti, 1946).

Мечение красителями

Большинство эмбрионов не настолько предусмотрительны, чтобы иметь клетки разного цвета. В начале XX в. Фогт (1929) отслеживал развитие различных участков икринок амфибий, нанося на области интереса **витальные красители**. Они окрашивают клетки, но не убивают их. Фогт смешивал красители с агаром и распределял по стеклу для микроскопии до высыхания. Кончики высушенных мазков агара были очень тонкими. Фогт отрезал от них кусочки и наносил их на эмбрион лягушки. После того как краситель окрашивал клетки, он убирал кусочек агара и мог проследить движения окрашенной клетки в эмбрионе (рис. 1.14).

Трудность работы с витальными красителями состоит в том, что они разбавляются с каждым клеточным делением, и со временем наблюдать клетки становится все труднее. Проблему можно обойти, используя **флуоресцентные красители**: их интенсивность такова, что, введя в отдельную клетку, краситель можно детектировать в ее потомках много делений спустя. Конъюгированный с флуоресцеином декстран, например, можно ввести в одну из клеток раннего эмбриона, и потомков этих клеток можно наблюдать, изучая эмбрион под ультрафиолетовым светом (рис. 1.15).

Генетические метки

Еще один способ постоянного мечения клеток и отслеживания их судеб — создание эмбрионов, в организме которых находятся клетки с разными генотипами. Один из лучших примеров этой техники — получение **химерных эмбрионов**, т. е. эмбрионов, чьи ткани происходят более чем из одного генетического источника. К примеру, химеры курицы и перепелки создают, пересаживая клетки перепелки в куриный эмбрион, пока тот находится еще в яйце. Эмбрионы курицы и перепелки развиваются схожим образом (особенно на ранних стадиях), и пересаженные клетки перепелки интегрируются в куриный эмбрион, участвуя в построении различных органов (рис. 1.16А). У вылупившегося цыпленка в определенных местах, в зависимости от места пересадки, будут присутствовать клетки перепелки. Клетки перепелки *в отличие* от куриных имеют несколько важных особенностей, в том числе видоспецифичные белки иммунной системы. Используя специфичные для перепелки белки, можно обнаружить отдельные перепелиные клетки, даже если они «спрятаны» внутри обширной популяции куриных (рис. 1.16Б). Наблюдая за миграцией кле-

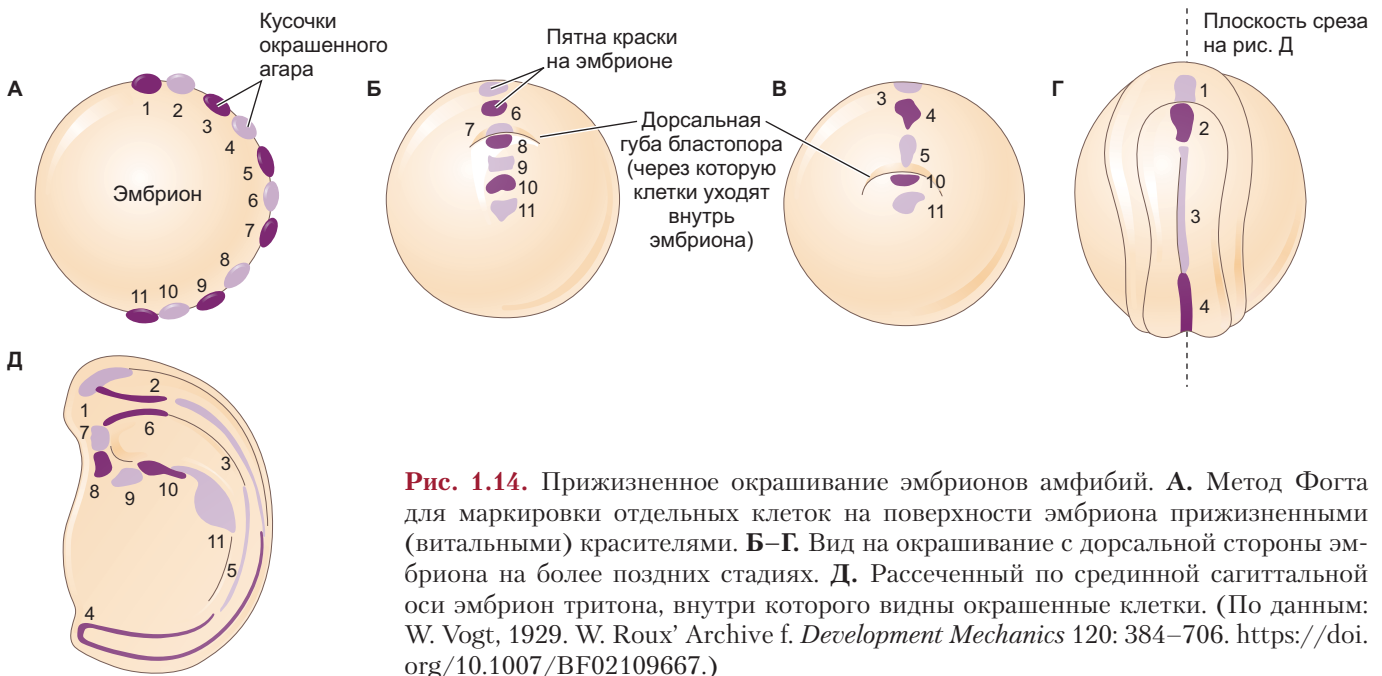
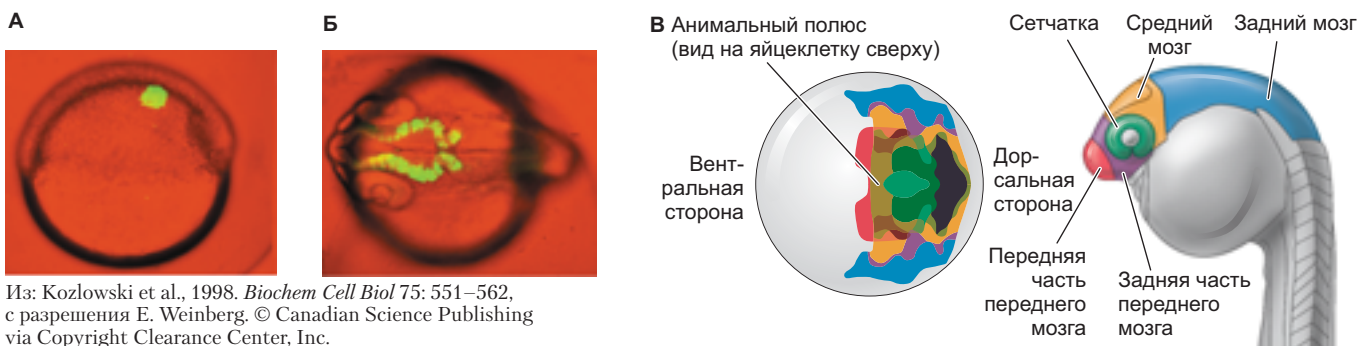


Рис. 1.14. Прижизненное окрашивание эмбрионов амфибий. **А.** Метод Фогта для маркировки отдельных клеток на поверхности эмбриона прижизненными (витальными) красителями. **Б–Г.** Вид на окрашивание с дорсальной стороны эмбриона на более поздних стадиях. **Д.** Рассеченный по срединной сагитальной оси эмбрион тритона, внутри которого видны окрашенные клетки. (По данным: W. Vogt, 1929. W. Roux' Archive f. *Development Mechanics* 120: 384–706. <https://doi.org/10.1007/BF02109667>.)

ток, исследователи смогли составить подробные карты куриного мозга и скелета (Le Douarin, 1969; Le Douarin and Teillet, 1973).

Химеры убедительно подтвердили предположение об обширных миграциях клеток нервного гребня в ходе развития позвоночных. Мэри Роулз (Rawles, 1940) показала, что пигментные клетки (меланоциты) курицы происходят из **нервного гребня** — полосы клеток, временно соединяющей нервную трубку с эпидермисом. Когда она пересаживала небольшие участки ткани, содержащие нервный гребень, от пигментированной породы кур в анало-

гичную позицию в эмбрионе непигментированной породы, мигрирующие пигментные клетки проникали в эпидермис и далее в перья (рис. 1.16В). Используя похожую технику, Рис (Ris, 1941) показал, что почти весь пигмент на поверхности куриного эмбриона происходит из мигрирующих клеток нервного гребня, пигмент сетчатки формируется внутри нее и не зависит от мигрирующих клеток нервного гребня. Это наблюдение подтвердилось и в случае химер курицы с перепелкой — у них пигментация и структура перьев были образованы клетками нервного гребня перепелки.



Из: Kozłowski et al., 1998. *Biochem Cell Biol* 75: 551–562, с разрешения E. Weinberg. © Canadian Science Publishing via Copyright Clearance Center, Inc.

Рис. 1.15. Картирование линии развития с использованием флуоресцентных красителей. **А.** В определенные клетки эмбриона *Danio* был введен флуоресцентный краситель, не диффундирующий из клеток. Далее краситель был активирован лазером в небольшой (около пяти клеток) области эмбриона на стадии завершения дробления. **Б.** По завершении образования центральной нервной системы клетки с красителем визуализировали светом с определенной длиной волны. Флуоресцентный краситель можно наблюдать в отдельных клетках, образующих передний и средний мозг. **В.** Карта клеточных судеб для центральной нервной системы *Danio*. Флуоресцентные красители инъецировали в клетки через 6 ч после оплодотворения (слева), результаты в виде цветового кода представлены на вылупившейся рыбке (справа). Перекрытие цветов означает, что клетки из этих областей 6-часового эмбриона вносят вклад в две или несколько областей. (Рис. В из: K. Woo and S. E. Fraser, 1995. *Development* 121: 2595–2609.)

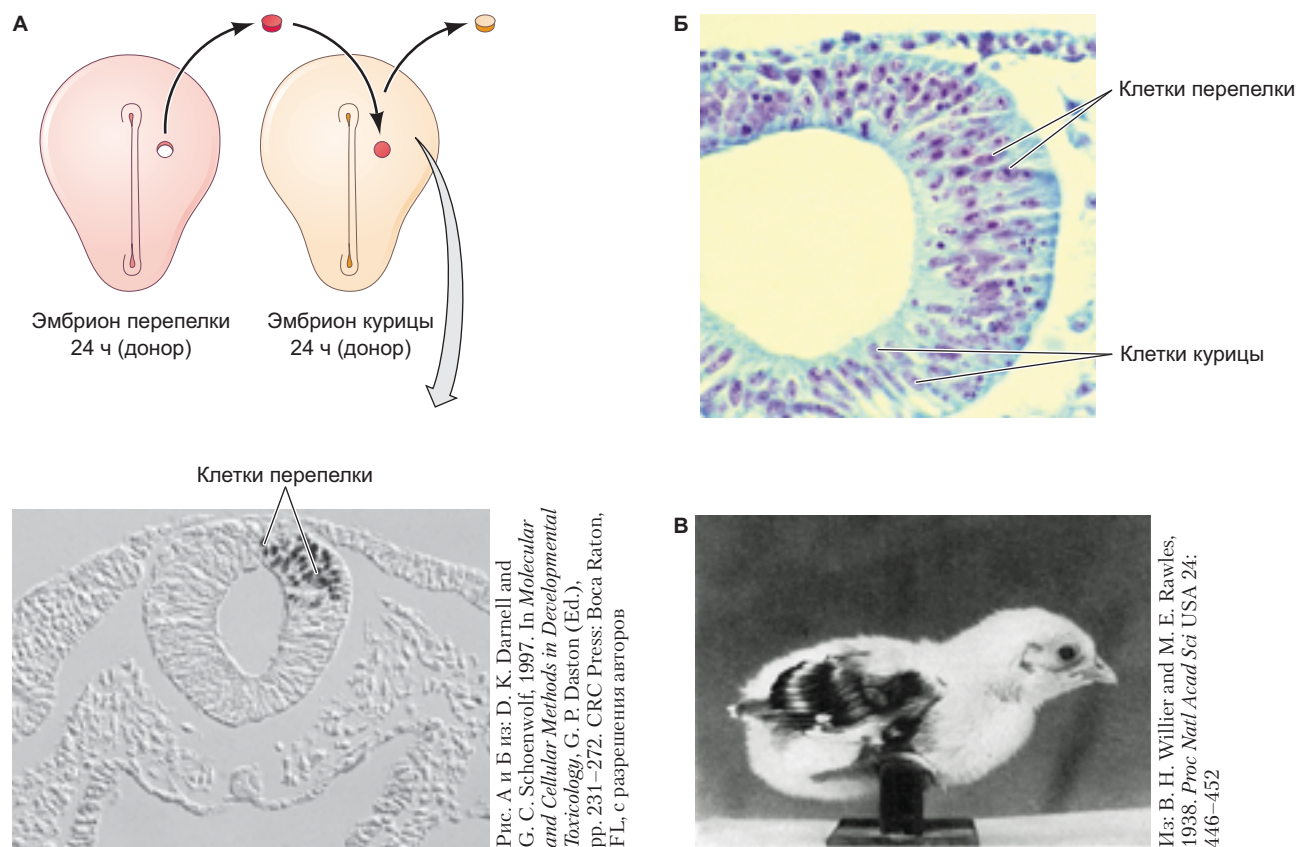


Рис. 1.16. Генные маркеры для отслеживания клеточных линий. **А.** Эксперимент, в ходе которого клетки из определенной области однодневного эмбриона перепелки пересаживали в аналогичную область однодневного куриного эмбриона. Через несколько дней клетки перепелки можно отслеживать, используя антитела к специфичным для нее белкам (фотография снизу). Из этой области происходят клетки, входящие в нервную трубку. **Б.** Клетки курицы и перепелки также можно различить по гетерохроматину в ядрах. У клеток перепелки одно плотное ядрышко (темно-фиолетовый), отличающее их от клеток курицы с диффузным ядрышком. **В.** Цыпленок, сформировавшийся в результате трансплантации участка нервного гребня туловища из эмбриона пигментированной породы в ту же область эмбриона непигментированной породы цыплят. Клетки нервного гребня, мигрировав, дали начало пигментированному эпидермису крыла и перьям

Химеры с трансгенной ДНК

У большинства животных соединить два вида в химерный организм затруднительно. Проблему можно обойти, трансплантируя клетки из генетически модифицированного организма. При использовании такой техники генетическую модификацию затем можно отследить в экспрессирующих ее клетках. Так, можно инфицировать клетки эмбриона генетически измененным вирусом, экспрессирующим ген флуоресцентно активного белка, такого как **зеленый флуоресцентный белок** (green fluorescent protein, GFP)¹.

¹ Зеленый флуоресцентный белок встречается в природе у некоторых медуз. Для него характерна яркая зеленая флуоресценция под воздействием ультрафиолетового света, которую активно используют в качестве трансгенной метки. GFP-мечение будет присутствовать на многих фотографиях в этой книге.

Измененный ген называют **трансгеном**, потому что он содержит ДНК другого вида. Когда инфицированные эмбриональные клетки пересаживаются хозяину дикого типа, только клетки донора и их потомки экспрессируют зеленый флуоресцентный белок; в ультрафиолетовом свете они излучают видимое зеленое свечение (Affolter, 2016; Papaioannou, 2016).

Вариации с трансгенной меткой позволяют получить удивительно точную карту развивающегося тела. Фрим с коллегами (Freem et al., 2012) использовали трансгенные методы для изучения миграции клеток нервного гребня в кишечник куриного эмбриона, где те образуют нейроны, координирующие перистальтику — сокращения мышц кишечника, необходимые для выведения остатков. Родителей GFP-меченого куриного эмбриона заражали неспособным реплицироваться вирусом, несущим активный ген GFP. Этот ген был унаследован куриным эмбрионом и экспрессирован в каждой его клетке. Так

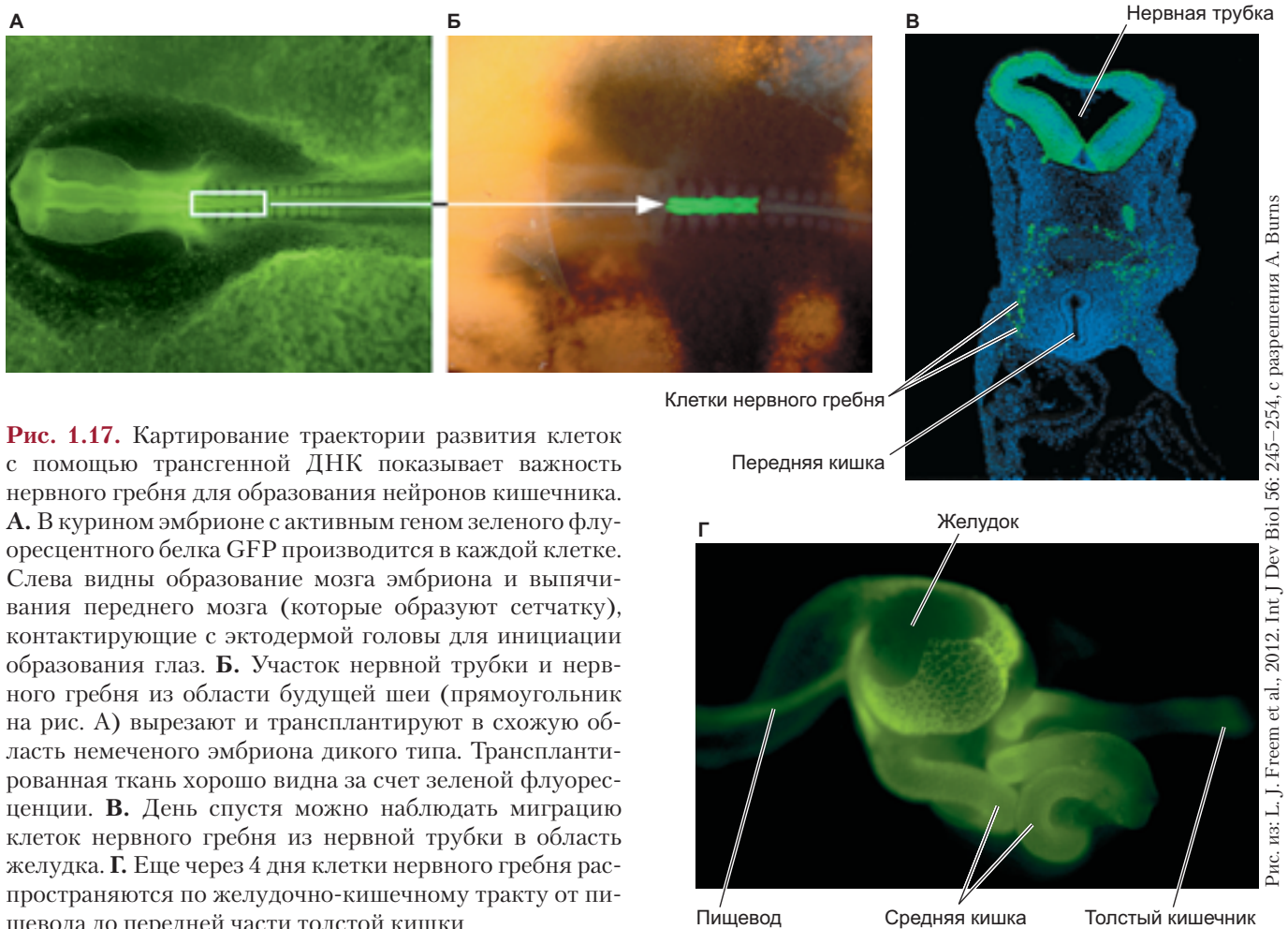


Рис. из: L. J. Freem et al., 2012. Int. J. Dev Biol 56: 245–254, с разрешения А. Burns

ТАБЛИЦА 1.2. Законы Бэра в отношении эмбриологии позвоночных

1. Общие свойства большой группы животных проявляются в развитии раньше, чем специализированные черты более мелких групп.

Сразу после гастрюляции все развивающиеся позвоночные очень похожи. У всех есть жаберные дуги, хорда, спинной мозг, примитивные почки. Лишь на более поздних этапах развития возникают отличительные черты класса, порядка и, наконец, вида.

2. Из самых общих черт развиваются более частные, пока наконец не появятся самые специализированные.

Изначально у всех позвоночных кожа построена одинаково. Лишь на более поздних стадиях развиваются чешуя у рыб и рептилий, перья у птиц, волосы, когти и ногти у млекопитающих. Ранние этапы развития конечности в принципе одинаковы у всех позвоночных. Лишь на более поздних стадиях становятся заметными различия между ногами, крыльями и руками.

3. Эмбрион определенного вида, вместо того чтобы проходить взрослые стадии «низших» животных, все больше и больше отдаляется от них.

К примеру, жаберные дуги у всех позвоночных вначале одинаковы (рис. 1.12). Однако дуга, которая становится опорой челюстей у рыб, у рептилий входит в состав черепа, а у млекопитающих преобразуется в косточки среднего уха. Млекопитающие никогда не проходят через стадию, напоминающую рыб (Riechert, 1837; Rieppel, 2011)

4. Таким образом, ранний эмбрион «высших» животных никогда не бывает похож на «низших» животных, но бывает похож на их ранние эмбрионы.

Эмбрионы человека никогда не проходят стадию, эквивалентную взрослой рыбе или птице. Скорее изначально они обладают общими чертами с эмбрионами рыб и птиц. Позднее развитие млекопитающих и других животных дивергирует, и одни никогда не проходят стадий, характерных для других.

Фрим с коллегами создали куриный эмбрион, каждая клетка которого светится зеленым (рис. 1.17А). Затем они пересаживали нервную трубку и нервный гребень GFP-трансгенного эмбриона в то же положение эмбриона дикого типа (рис. 1.17Б). День спустя происходила миграция GFP-меченых клеток в область желудка (рис. 1.17В), а еще через 4 дня весь кишечник, от передней части до толстой кишки, светился зеленым (рис. 1.17Г).

Эволюционная эмбриология

«Общность эмбриональных структур доказывает общность происхождения», — заключил Чарльз Дарвин в книге «Происхождение видов» в 1859 г. Это высказывание основано на эволюционной интерпретации Дарвином законов Карла Эрнста фон Бэра, согласно которой взаимосвязи групп могут быть установлены путем обнаружения общих эмбриональных или личиночных форм. В 1828 г., всего за несколько лет до путешествия Дарвина на корабле «Бигль», фон Бэр объявил о любопытном наблюдении. «У меня в спирте зафиксированы два ранних эмбриона, которые я забыл пометить. Теперь я не в состоянии определить, к какой группе они относятся. Это могут быть ящерицы, небольшие птицы и даже млекопитающие». Изображения таких ранних эмбрионов помогают нам понять его затруднение (рис. 1.18).

В результате детального исследования развития курицы и сравнения куриных эмбрионов с эмбрионами других позвоночных фон Бэр сделал четыре обобщения, известные как законы Бэра (табл. 1.2). Законы Бэра описывают развитие позвоночных

Ящерица

Человек



Из: F. Keibel 1904, 1908, *Normatafel zur Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere*, Heft IV, VIII. Gustav Fischer: Jena

Рис. 1.18. Развитие всех позвоночных — рыб, амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих — начинается очень по-разному в силу огромных различий в размере их яйцеклеток. Тем не менее к началу нейруляции эмбрионы всех позвоночных приходят к общему строению. Здесь рядом представлены эмбрионы ящерицы и человека на схожих стадиях. От стадии нейрулы по мере дальнейшего развития эмбрионы различных групп позвоночных становятся все меньше и меньше похожими друг на друга

от простых эмбрионов с общими чертами ко все более специализированным, проявляющим видоспецифичные черты. К примеру, эмбрионы человека изначально обладают чертами, схожими с эмбрионами рыб и птиц, но позже их развитие дивергирует, и человек никогда не проходит в развитии взрослые стадии низших позвоночных. Недавние исследования подтвердили взгляды Бэра о существовании **филотипической стадии**, на которой эмбрионы разных групп позвоночных обладают схожей физической структурой, как на стадии, показанной на рис. 1.18. Именно на этой стадии, по-видимому, меньше всего различий в экспрессии *генов* у разных групп позвоночных, что позволяет считать этот период возможным источником базового плана строения всех позвоночных (Irie and Kuratani, 2011)¹.

По прочтении краткого изложения законов Бэра в версии Йоханнеса Мюллера в 1842 г. Дарвин увидел, что сходство эмбрионов может быть веским аргументом в пользу эволюционной связи различных групп животных. Еще до Дарвина личиночные формы использовали в таксономической классификации (рис. 1.19). К примеру, в 1830 гг. Дж. В. Томпсон показал, что личинки усоногих раков почти идентичны личинкам креветок, из чего сделал вывод (совершенно верный) о том, что усоногие раки являются членистоногими, а не моллюсками (Winsor, 1969). Дарвин, бывший экспертом в таксономии усоногих, с восторгом принял это открытие: «Даже прославленный Кювье не осознавал, что бальянус относится к ракообразным, но вид личинки подтверждает это безошибочно». Подоным образом Александр Ковалевский (1866) открыл, что личинка прикрепленного оболочника (асцидии) обладает определяющим признаком хордовых — так называемой хордой², причем она происходит из тех же тканей раннего эмбриона, что хорда рыб или птиц. Из этого Ковалевский сделал вывод, что беспозвоночные оболочники родственны позвоночным животным, а два крупных домена животного царства — беспозвоночные и позвоночные — таким образом объединены личиночными структурами.

¹ Действительно, согласно одному из определений, тип — это группа видов, внутри которой экспрессия генов на филотипической стадии высоко консервативна и отличается от таковой у других видов (Levin et al., 2016). В то же время еще присутствуют разногласия касательно того, что считать типом. К примеру, некоторые авторы рассматривают головохордовых (*Amphioxus*), оболочников и хордовых как отдельные типы, а другие объединяют их в один тип Хордовые.

² Хорда — это структура в виде тяжа, идущая вдоль средней линии тела эмбриона и выполняющая роль организационного центра для нейральных и других окружающих ее тканей. Она присутствует во всех зародышах позвоночных, а также у некоторых беспозвоночных, в т. ч. оболочников. Это определяющая черта хордовых (позвоночных и их беспозвоночных «кузенов» — оболочников и головохордовых, в том числе ланцетников).

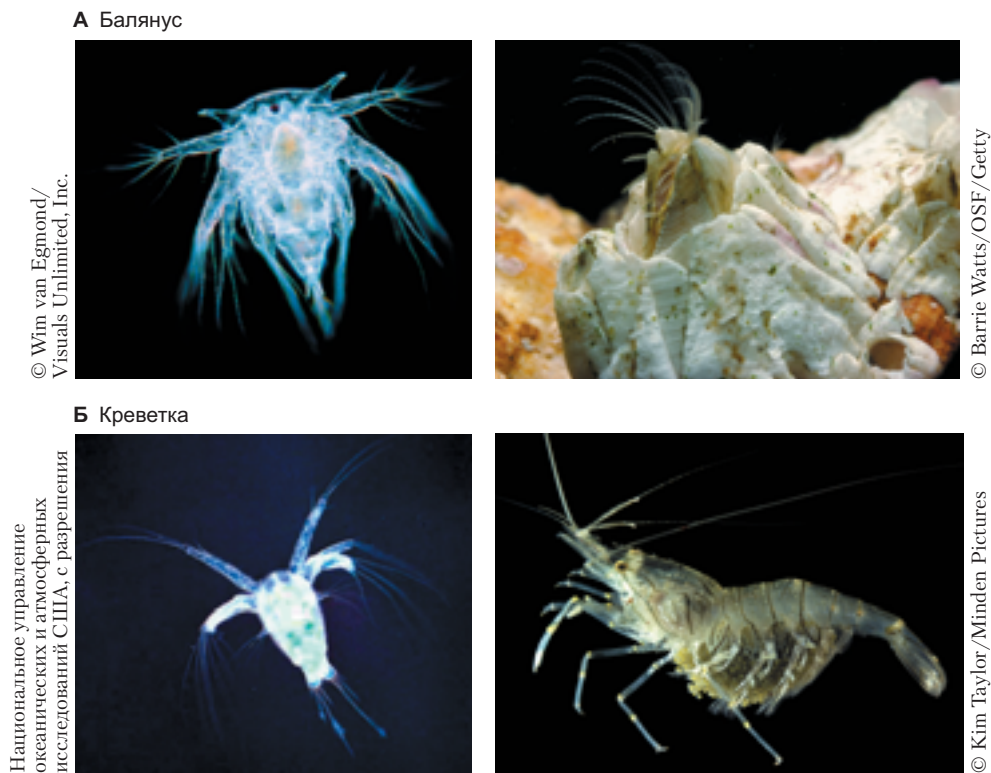


Рис. 1.19. На личиночных стадиях проявляется общность происхождения двух видов ракообразных, бальянусов (А) и креветок (Б). У обоих видов присутствует отличительная личиночная стадия (науплиус), которая подчеркивает их принадлежность к ракообразным и членистоногим, несмотря на то что взрослые бальянусы (когда-то классифицировавшиеся как моллюски) и формой тела, и прикрепленным образом жизни отличаются от свободноплавающих взрослых креветок. Личинка в каждой паре показана на изображении *слева*, а взрослая особь — *справа*

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Хордовые и хорда, которая нас объединяет. Орла, динозавра, лягушку или рыбку-клоуна — всех их объединяет принадлежность к позвоночным. Признаком, на основании которого определяется принадлежность организма к хордовым (группе, включающей позвоночных), служит наличие хорды. Эта структура в виде гибкого тяжа проходит вдоль средней линии тела эмбриона и играет ключевую роль в организации всех окружающих тканей. Критический момент при переходе от беспозвоночных к позвоночным можно наблюдать у ланцетника *Amphioxus* — бентосного фильтрующего животного, напоминающего гибрид червяка и крошечной рыбки (**рис. 1.20А**). Хотя у *Amphioxus* нет костей или даже сколько-нибудь выраженного мозга, он связан с общим предком всех хордовых и обладает рудиментарными структурами хорды и нервного тяжа (García-Fernández and Benito-Gutiérrez, 2009). Это открытие Александра Ковалевского (1867) было крупной вехой в биологии. Стадии развития *Amphioxus* (и оболочников) объединили беспозвоночных и позвоночных в единое «царство животных».

Дарвин рукоплескал открытию Ковалевского и писал в «Происхождении человека» (1874), что, если полагаться на эмбриологию как наиболее безопасный подход к классификации, можно считать, что мы наконец обрели ключ к источнику происхождения всех позвоночных. Дарвин отмечал далее, что в эмбриональном развитии организмы иногда принимают структуру, не соответствующую их взрослой форме, но демонстрирующую родственные отношения с другими животными. Он указывал на наличие глаз у эмбрионов крота, рудиментов тазовых костей у эмбрионов змей, зубов у эмбрионов усатых китов.

Дарвин утверждал также, что способы адаптации, отдаляющие организм от «типичной» формы и позволяющие ему выживать в определенной среде, формируются на поздних этапах эмбрионального развития¹. Он отмечал при этом, что различия между

¹ Как впервые отметил Вейсман (1875), у личинок должны быть собственные способы адаптации. Взрослые бабочки-ленточники мимикрируют под монархов, но их гусеницы совсем не похожи на гусениц монархов. Они остаются незамеченными благодаря сходству с пометом птиц (Begon et al., 1986).

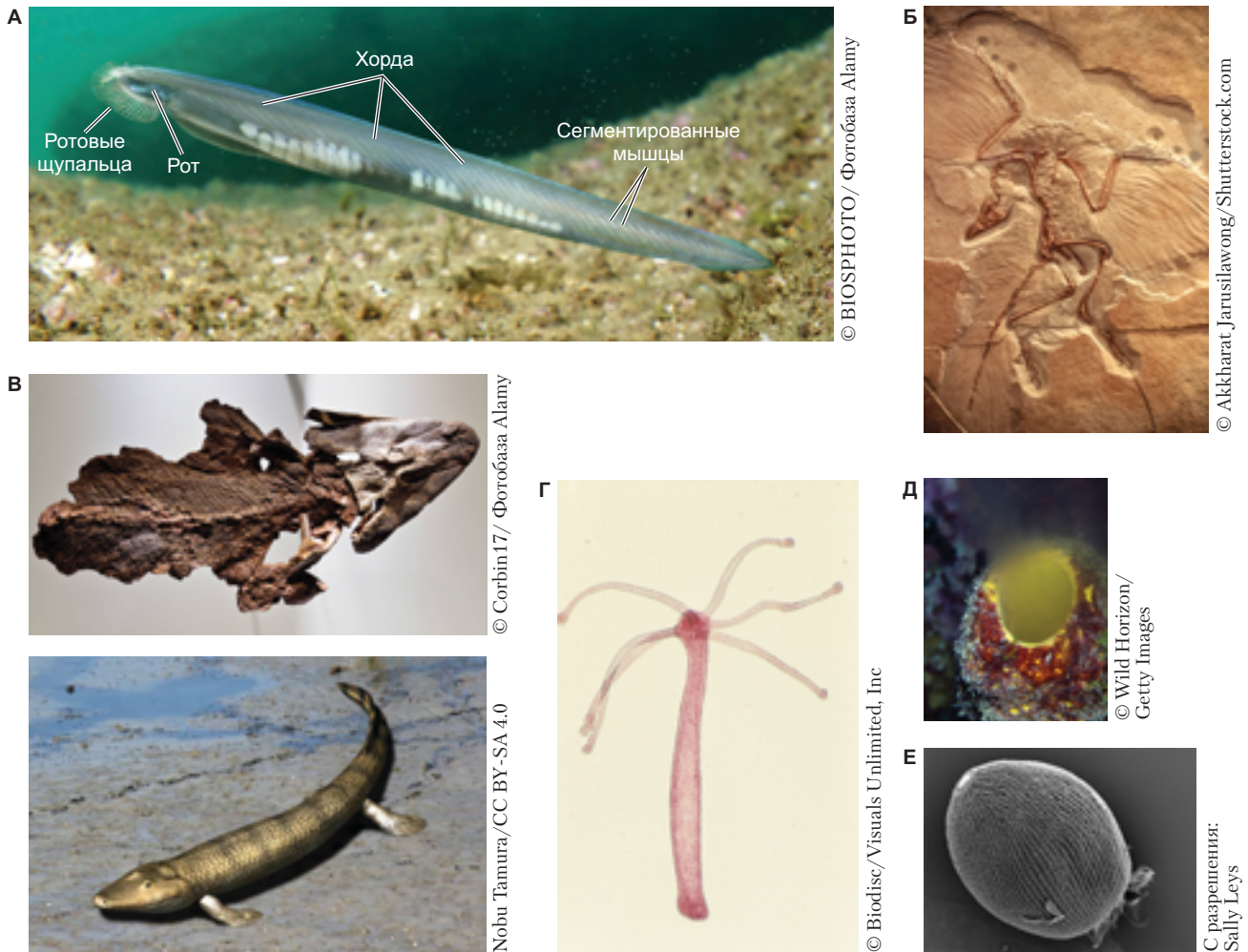


Рис. 1.20. Переходные состояния в эволюции животных. **А.** Ланцетник *Amphioxus*, обладающий примитивной хордой и нервным тяжем, близок к общему предку всех позвоночных. **Б.** На этой окаменелости *Archaeopteryx* конца юрского периода (~150 млн л. н.) видны его отличительные признаки — скелет рептилии и покрытые перьями крылья птицы одновременно. **В.** Считается, что 375 млн л. н. *Tiktaalik roseae* первым из животных вышел на сушу. У этой окаменелости (сверху) и ее реконструкции (снизу) можно наблюдать, помимо прочих особенностей, отличительные признаки одновременно плавников рыб и конечностей амфибий. **Г.** Полученная на сканирующем электронном микроскопе фотография гидры (стрекающие). **Д.** Асconoидная губка. Краска, размещенная у основания губки, выбрасывается сверху, что демонстрирует способ прокачивания губкой воды. **Е.** Подвижная личинка губки

видами в пределах рода в ходе развития увеличиваются, как и предсказывают законы Бэра.

Таким образом, Чарльзу Дарвину удалось все же обосновать два взгляда на «происхождение путем модификации».

Можно подчеркивать *общность происхождения*, указывая на сходства эмбрионов двух или более групп организмов, или же фокусироваться на *модификациях*, чтобы показать, как изменения развития порождают структуры, позволяющие животным и растениям адаптироваться к определенным условиям внешней среды.

Понимание древа жизни позволяет увидеть взаимосвязи в развитии его представителей

По оценкам ученых, Земля сформировалась 4,56 млрд л. н., а возраст первых достоверных следов жизни составляет 3,8 млрд лет. Фундаментальное положение теории эволюции состоит в том, что вся жизнь на Земле происходит от общего предка, известно-го как **LUCA** (от англ. last universal common ancestor — последний универсальный общий предок). Это означает, что между всеми формами жизни есть

родственные связи — между вами и слоном, рыбой-жабой¹ и жабой, медоносной пчелой и мечехвостом, жуткими паразитическими круглыми червями *Ascaris* и прекрасными каменистыми кораллами, грибами-головачами, почти 400 000 видами цветковых растений, 200 000 видами простейших и даже бактериями из вашего кишечника. Если все мы родственники, то механизмы, по которым развивается *Homo sapiens*, переходят от общих предков, связывающих все формы жизни в одну древовидную структуру — древо жизни (рис. 1.21).

Одним из наиболее важных разграничений, сделанных эволюционными эмбриологами, было разделение понятий *аналогии* и *гомологии*. Оба термина относятся к структурам, которые кажутся схожими. Сходство **гомологических** структур можно объяснить происхождением от общей предковой структуры. Например, крыло птицы и рука человека гомологичны и происходят от костей передней конечности общего предка. Более того, гомологичны и их составные части (рис. 1.22).

У **аналогичных** структур сходство обусловлено выполнением схожей функции, а не происхождением от общего предка. Например, крыло бабочки и крыло птицы аналогичны; они выполняют одну и ту же функцию (и называют их одним словом), но крыло птицы и крыло насекомого не имеют общей предковой структуры, которая дала обе эти структуры путем модификаций в ходе эволюции. Говоря о гомологии, необходимо всякий раз уточнять, на каком уровне организации происходит сравнение. Например, крылья птицы и летучей мыши гомологичны как передние конечности, но не как крылья. Другими словами, они имеют общую структуру костей передних конечностей, так как птицы и млекопитающие происходят от общего предка, обладавшего такими костями. Однако летучие мыши произошли от длинной цепочки нелетающих млекопитающих, а крылья птиц сформировались независимо от них из передних конечностей предковых рептилий (проследите ветви древа на рис. 1.21).

Как мы увидим в гл. 24, эволюционные изменения основаны на изменениях развития. Крыло летучей мыши, к примеру, построено: 1) отчасти за счет поддержания быстрого роста хрящей, образующих пальцы; 2) отчасти за счет предотвращения клеточной гибели, которая обычно имеет место в перепонках между пальцами. Как показано на рис. 1.23, у мышей изначально присутствуют эти перепонки (так же как и у людей и большинства других млекопитающих). Перепонки важны для создания анатомических различий между пальцами. Как только перепонка

отслужила службу, генетические сигналы заставляют ее клетки погибать, оставляя свободные пальцы, способные к захвату и манипуляциям. Однако летучие мыши используют пальцы для полета; это свойство обусловлено изменением экспрессии генов в клетках перепонки. Гены, активирующиеся в перепонке эмбрионов летучих мышей, кодируют белки, *предотвращающие* клеточную гибель, а также белки, ускоряющие удлинение пальцев (Crettekos et al., 2005; Sears et al., 2006; Weatherbee et al., 2006). Таким образом, гомологичные анатомические структуры могут дифференцироваться за счет изменений развития, и такие изменения обеспечивают разнообразие, необходимое для эволюционных перестроек.

Чарльз Дарвин наблюдал искусственный отбор пород собак и голубей, и эти примеры до сих пор служат ценным источником для изучения изменчивости вариантов отбора. Например, короткие ноги такс отбирали заводчики, желавшие использовать этих собак для охоты на барсуков в их подземных норах (название породы на немецком выглядит как *Dachshund* — от слов *Dachs* — барсук и *Hund* — собака). Мутации, приводящие к укорочению ног у такс, включают дополнительную копию гена *Fgf4*, кодирующего белок, который сообщает предшественникам хрящевых клеток, что они прошли достаточно делений и могут приступить к дифференцировке. С этой дополнительной копией *Fgf4* хрящевые клетки получают указание к остановке деления раньше, чем у большинства других собак, поэтому их ноги прекращают расти (Parker et al., 2009). Длинношерстные таксы отличаются от своих короткошерстных родичей мутацией в гене *Fgf5* (Cadieu et al., 2009). Этот ген вовлечен в образование волоса и позволяет каждому фолликулу строить более длинный стержень волоса (Ota et al., 2002). Именно в эмбрионе генотип транслируется в фенотип, а унаследованные гены экспрессируются, чтобы сформировать взрослый организм. Таким образом, мутации в генах, контролирующих процессы развития, могут создавать варианты отбора.

КЛЮЧЕВЫЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ ПЕРЕХОДЫ В ЭВОЛЮЦИИ ЖИВОТНЫХ

Откуда мы знаем, что определенная форма животных действительно предшествовала эволюции другой формы? Нельзя сказать, что мы буквально видели, как отрастают перья на конечностях ящерицы и она взмывает в небо. Однако существуют примеры существ, демонстрирующих черты двух близко связанных видов, так называемое переходное морфологическое состояние. Исследуя переходные организмы на протяжении эволюционной истории многоклеточных животных (всех животных), мы можем выявить некоторые важные аспекты эмбрионального развития, которые менялись, приводя

¹ По скромному мнению авторов, рыба-жаба — самая уродливая рыба в океане. Так что можете считать приведенный пример переходом на личности. Да шутим, шутим. Можете посмеяться (над шуткой или над нами — все зависит).

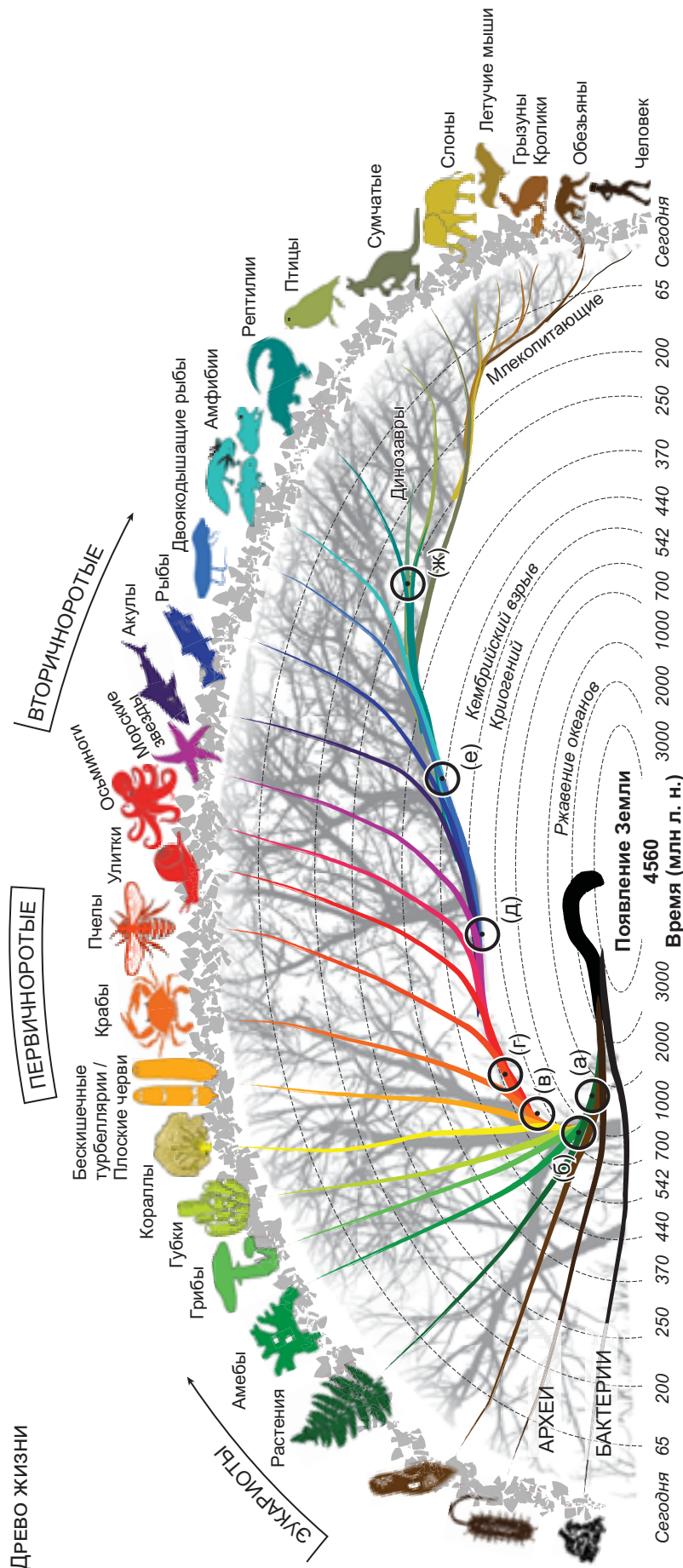
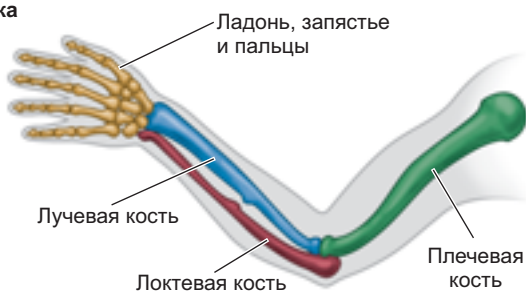
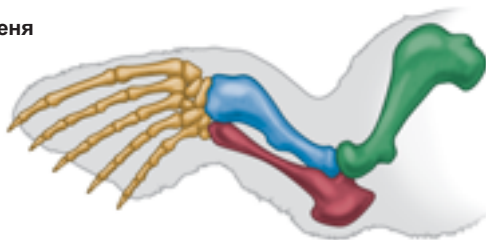


Рис. 1.21. Древо жизни — схема основных ветвей эволюции живого. Геологическая шкала расположена радиально от нижней части схемы к верхней. Все живое на Земле связано. Чтобы наглядно продемонстрировать этот факт, часть основных групп организмов упрощенно обозначена цветными ветвями. Нижележащий слой серых веток обозначает хаотичный характер происхождения форм живого. Буквы (а–ж) указывают положение общих предков, в том числе предка расщеплений (б) и предка многоклеточных (а) организмов. Предков бесклеточных и плоских червей, насекомых, позвоночных и наземных животных (кольчатых червей, членистоногих, моллюсков, иглокожих и позвоночных) (в–е) можно проследить вплоть до Кембрийского взрыва

Рука человека



Конечность тюленя



Крыло птицы



Крыло летучей мыши

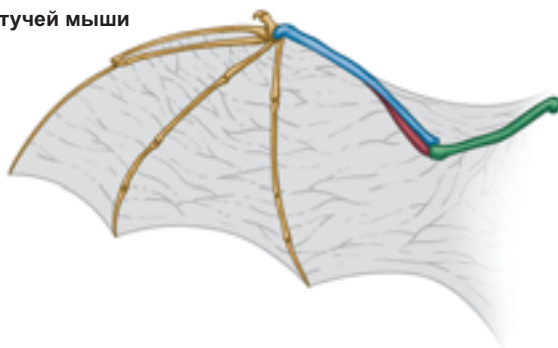


Рис. 1.22. Гомология структур руки человека, передней конечности тюленя, крыла птицы и крыла летучей мыши; гомологичные опорные структуры выделены одним и тем же цветом. Все четыре структуры происходят от конечности общего предка позвоночных и соответственно как передние конечности гомологичны друг другу. Однако способы адаптации птиц и летучих мышей к полету развились независимо друг от друга спустя долгое время после того, как эти две линии разошлись от общего предка. Таким образом, их крылья не гомологичны, а аналогичны

к морфологическому разнообразию, наблюдаемому нами сегодня. К примеру, в палеонтологической летописи было обнаружено сочетание плавников и ног у *Tiktaalik roseae*, указывающее на него как на первый водный вид, вышедший на сушу. Схожим образом окаменелости динозавра *Archaeopteryx* обладают скелетом рептилии и перьями птицы, демонстрируя эволюционное родство между динозаврами и птицами и морфологический переход от одних к другим (см. рис. 1.20Б, В; см. также Stefan Rensing, 2016).

ОТ ОДИНОЧЕСТВА К МНОЖЕСТВУ

Основополагающим эволюционным шагом, необходимым для появления животных, был переход от единственной клетки к множеству различных клеток, или **многоклеточности**. Было подсчитано, что за всю историю Земли многоклеточность независимо возникала 25–50 раз! Тем не менее сегодня существует лишь шесть основных групп многоклеточных организмов: бурые, зеленые и красные водоросли, наземные растения, грибы и животные.

Хотя существует множество правдоподобных идей о возникновении многоклеточности, колониальная теория представляется преобладающей теорией для объяснения многоклеточности животных. При рассмотрении наиболее примитивных животных — губок — на ум приходит особый тип их жгутиковых клеток — вспомните упомянутые ранее **хоаноциты**. Строение этих «воротничковых» клеток, а также их фильтрующую функцию принято считать гомологичными одноклеточным или колониеобразующим **хоанофлагеллятам** (рис. 1.24; Nosenko et al., 2013; Nielsen, 2008). Наиболее интересны белки многоклеточных контактов, найденные в хоанофлагеллятах, включающие весьма консервативные, присутствующие и у трехслойных двусторонне-симметричных животных (у нас). Среди этих белков — определяющие межклеточную адгезию кадгерина. В самом деле, утрата лептинподобного гена (известного бифункционального сигнального агента и рецептора адгезии, который повышает экспрессию кадгерина у некоторых животных) у **сохранившихся** (ныне живущих) хоанофлагеллят предотвращает адгезию между одиночными клетками и образование характерных колоний-розеток (Levin et al., 2014). Согласно гипотезе, 3 млрд л. н., как и сегодня, древние хоанофлагелляты образовывали рыхлые колонии (см. рис. 1.24). Мутации в генах, кодирующих белки клеточной адгезии, приводили к образованию плотных контактов между соседними хоанофлагеллятами, что способствует обмену между клетками питательными веществами и их выживанию. Так зародился первый многоклеточный организм, состоящий из одноклеточной полой сферы хоаноцитов (представьте трехмерную розетку); для него было

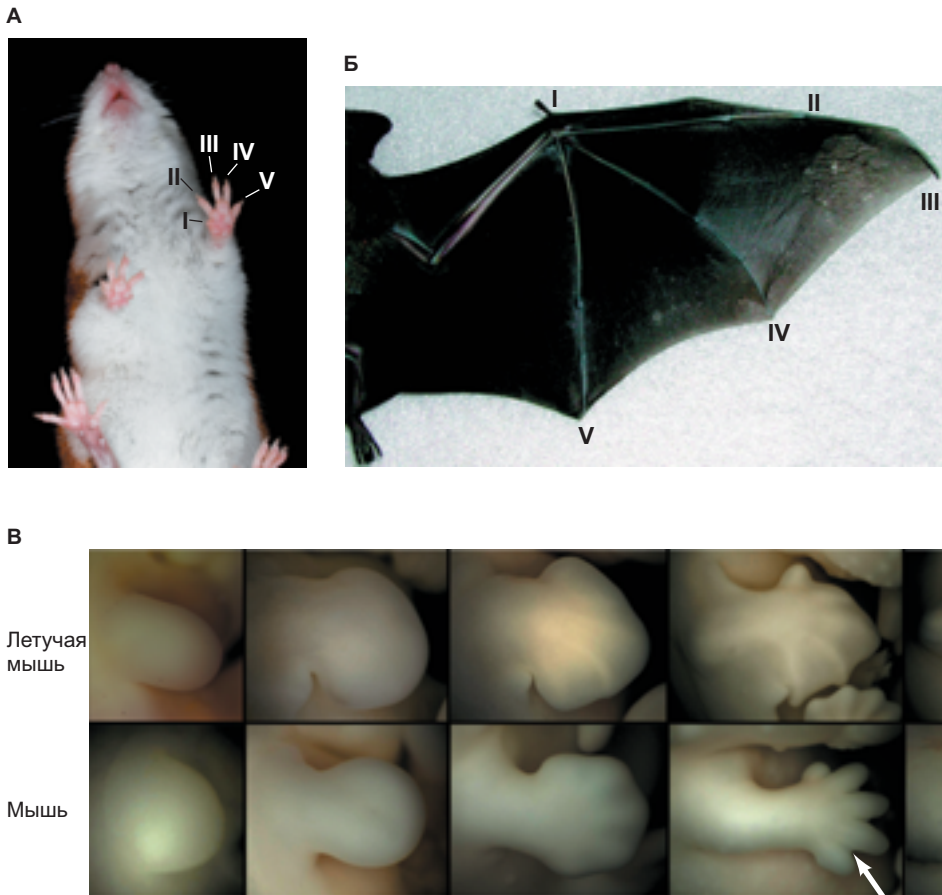


Рис. Б и В из: С. J. Cretekos et al., 2008. *Genes Dev* 22: 141–151, с разрешения С. J. Cretekos © Cold Spring Harbor Laboratory Press

Рис. 1.23. Развитие передней конечности мыши и летучей мыши. Туловища мыши (А) и летучей мыши (Б), видны передняя конечность мыши и крыло летучей мыши с удлинненными пальцами и выраженными перепонками. Пальцы пронумерованы у обоих животных (I — большой палец; V — мизинец). В. Морфогенез передних конечностей мыши и летучей мыши. Обе конечности вначале имеют перепонки, но между пальцами мыши они отмирают на 14-й день эмбрионального развития (стрелка). Перепонки на конечности летучей мыши не отмирают и поддерживаются по мере роста пальцев

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ИСТОКИ БИЛАТЕРАЛЬНОЙ СИММЕТРИИ И НАШИ ТРИ ЗАРОДЫШЕВЫХ ЛИСТКА

Считается, что билатеральная симметрия, наблюдаемая у большинства групп животных, произошла от более морфологически простых вариантов радиальной или сферической геометрии, наподобие тех, что мы наблюдаем у современных стрекающих (медуз, кораллов, гидр и их родственников; см. рис. 1.20Г). Несмотря на свою древность, стрекающие уже обладают нервной системой, кишечной полостью и даже мышцами. У двусторонне-симметричных животных (билатерий) эти три типа тканей происходят из трех различных зародышевых листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы. В анатомии стрекающих просматриваются только два листка, которые исходно посчитали эктодермой и энтодермой, в связи с чем появление третьего,

мезодермального, листка считали «изобретением» первых билатерий. Однако генетические исследования выявили экспрессию специфических для мезодермы генов в эмбрионах стрекающих, что привело ученых к предположению о наличии у них промежуточного зародышевого листка — мезэнтодермы (Holland, 2000); это поставило бы стрекающих в положение переходного звена в эволюции третьего зародышевого листка — мезодермы. Недавно было высказано интересное предположение, что два слоя, из которых построено тело стрекающих, могут включать области эктодермы, экспрессирующей гены, типичные для энтодермы билатерий, и области энтодермы, экспрессирующей типично мезодермальные гены. Это открытие вызвало бурю вопросов о гомологии зародышевых листков стрекающих и двусторонне-симметричных животных (Steinmetz et al., 2017).

ИСТОКИ ГАСТРУЛЯЦИИ

Вокруг вопроса о том, проходит ли эмбрион губок ключевой для развития процесс гастрюляции (клеточных движений в эмбрионе, порождающих зародышевые листки и первичную кишку), существуют разногласия. У взрослых губок образуются каналы с камерами, покрытыми хоаноцитами — жгутиковыми клетками, вызывающими однонаправленный ток воды через организм (см. рис. 1.20Д). В большинстве случаев взрослая губка образуется опосредованно, путем метаморфоза свободноплавающей личинки — физической смены сферического эмбрионального и личиночного плана строения на взрослый вариант прикрепленной фильтрующей камеры (см. рис. 1.20Е). Однако нельзя отрицать, что эмбрион и личинка губок обладают выраженной передне-задней осью с внутренними и наружными тканями. Это указывает на раннее происхождение эпителиев (немигрирующих тканей, состоящих из плотно прилегающих клеток) с дифференциальной разметкой вдоль некой оси — фенотипа в развитии, который необходим для построения сложных слоистых тканей и образования первичной кишки (Maldonado, 2006; Nakanishi et al., 2014). Было высказано предположение, что личинки некоторых древних губок (гомосклероморф) проходили половое созревание до метаморфоза в молодую губку. Это освобождало бы гомосклероморф от созревания во взрослую

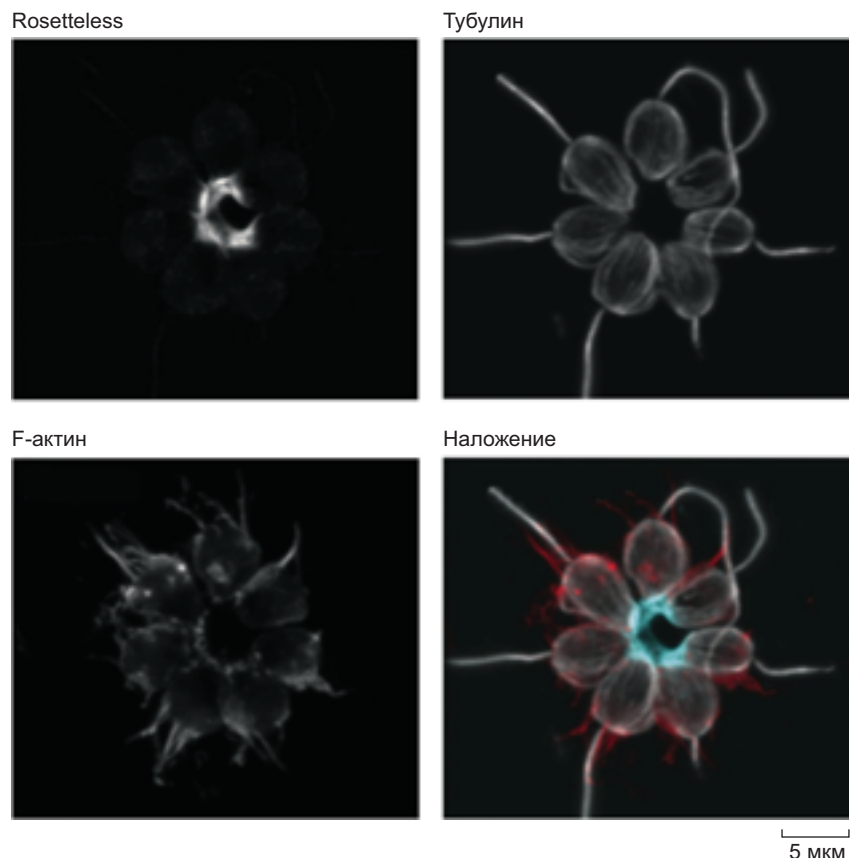
форму, открывало бы возможность естественного отбора более плотных контактов эпителиальных клеток, способных поддерживать движения гастрюляции и в итоге — эволюцию диплопластических (двуслойных) многоклеточных, таких как стрекающие (Nielsen, 2008).

предложено название **хоанобластия** (Nielsen, 2008). Дальнейшая эволюция ветви животных от хоанобластии шла по пути адаптации эпителия к более сложным задачам и тканевым движениям, что дало начало древним гомосклероморфам (особой группе губок) и привело к зарождению многоклеточного эмбриона (см. рис. 1.25, шаги 1–3). Далее в книге вы узнаете, что те же типы белков клеточной адгезии, которые изначально способствовали многоклеточности, играют ключевые роли в процессах формирования тканей в эмбриогенезе.

История развития наземных растений

Растения представляют собой важную группу для сравнения с животными в плане эволюции и развития. Вы знали, что все наземные растения проходят зародышевое развитие? Наземные растения приобрели эмбриональную стадию в качестве адаптивной

Рис. 1.24. Общий предок всех животных был близок к хоанофлагеллятам. Здесь показаны ныне живущие хоанофлагелляты, образующие колонию-розетку. Их клетки были окрашены антителами к белкам Rosetteless (лептиноподобный белок; бирюзовый в наложении), тубулину (помещающему жгутики; белый в наложении) и филаментам актина (F-актину, помечающему «воротничок» из микроворсинок; красный в наложении)



Все рис. из: T. C. Levin et al., 2014. *eLife* 3: e04070/CC BY 4.0

черты, когда из воды перешли к наземному образу жизни, и поэтому их метко называют **эмбриофитами**. Сходства, присутствующие в развитии животных и растений, эволюционировали независимо, но все равно сошлись к близким механизмам. Эта независимая эволюция двух типов эмбрионов представляет невероятно важную возможность для изучения биологии развития как растений, так и животных (Meyerowitz, 2002; Vervoort, 2014; Drost et al., 2017). Идентификация в развитии общих черт и несоответствий, стоящих за разметкой тела, морфогенезом, размножением и органогенезом растений и животных, может пролить свет на ключевые принципы биологии развития.

LECA: ОБЩЕЕ НАЧАЛО

Без сомнения, вы не понаслышке знаете, что эмбриофиты обладают невероятным разнообразием форм, размеров, цветов и даже запахов. Растениями можно восхищаться, а эволюция развития этого разнообразия дает пищу для размышлений. Как и животные, растения состоят из эукариотических клеток, что дает представление о природе последнего общего предка растений и животных.

Филогенетический анализ указывает на то, что последний общий предок растений и животных (а также грибов) был одноклеточным простейшим с жгутиками и митохондриями (Niklas, 2013).

Гипотетический **последний общий предок эукариот** (last eukaryotic common ancestor, LECA) дал две дивергировавшие ветви (см. рис. 1.21 и **рис. 1.25**): одна привела к эволюции хоанофлагеллят и произошедших от них многоклеточных животных, а другая обзавелась вторыми эндосимбиотическими отношениями¹, на этот раз с цианобактериями — фотосинтезирующими прокариотами. Эти автотрофные бактерии по какой-то причине не были переварены и процветали внутри эукариотической клетки. Отношения со временем стали симбиотическими и дали начало предкам зеленых водорослей с единственной фотосинтезирующей пластидой (см. рис. 1.25, шаг 17). **Пластиды** — органеллы растительной клетки, выполняющие многие функции, в том числе фотосинтез.

Способность синтезировать собственную пищу (**автотрофность**), используя солнечную энергию, определила первичную движущую силу выживания растений, состоящую в том, что ключевым фактором, ограничивающим эволюцию растений, всегда был доступ к солнечному свету, воде и углероду. Переход от пресноводных водорослей к наземным растениям вызвал чрезвычайно резкий скачок уровня атмосферного кислорода, который в свою очередь послужил топливом для **Кембрийского взрыва** — массовой диверсификацией водной и наземной жизни (Judson, 2017).

Результаты недавно проведенного секвенирования генома *Chara braunii* убедительно свидетельствуют, что все эмбриофиты произошли от **харофитовых водорослей** (Nishiyama et al., 2018; Martin and Allen, 2018). Уточним, что ныне живущий *C. braunii* является сохранившимся видом, родственным предковым харофитовым водорослям (**рис. 1.26**). Несмотря на то что *C. braunii* — пресноводная зеленая водоросль, в действительности она больше похожа на наземное растение². Она обладает рудиментарными корнями, прикрепляющими ее к твердым субстратам, жесткой целлюлозной стенкой и ортологами генов, входящих в сигнальные системы **фитогормонов**, необходимых для роста и дифференцировки клеток наземных растений (в том числе сигнальные пути ауксина и цитокинина; Rensing, 2018; см. рис. 1.25, шаг 21).

НОВЫЙ КЛЕТОЧНЫЙ ПУТЬ — ДЕЛИТЬСЯ И ПОКОРЯТЬ

Обеспечив прочность и надежную защиту, клеточная стенка растений своей жесткостью наложила на них существенное ограничение — полное подавление миграции клеток и тканей. Когда клетки эмбриофитов делятся, они применяют особый способ цитокинеза — образование **фрагмопласта**, обеспечивающего построение между двумя дочерними клетками новой клеточной стенки, навсегда закрепляющей их в данном положении в растении (см. рис. 1.25, шаг 20). Это имеет огромные последствия: в отличие от животных, эмбрионы растений не могут использовать движения гастрюляции для перемещения клеток в ходе развития. Вместо них растения используют для морфогенеза направленные асимметричные деления и экспансию клеток для обеспечения морфогенеза; данных механизмов оказалось более чем достаточно для формирования разнообразия растений во всей земной среде (Buschmann and Zachgo, 2016).

¹ Первым событием эндосимбиоза было поглощение эукариотической клеткой аэробной бактерии, которая в ходе эволюции стала митохондрией, с последующим образованием всех ветвей эукариот.

² Почему харофитовые водоросли были так хорошо подготовлены к завоеванию суши? Недавно было высказано предположение, что общий предок харофитов в действительности мог выйти на сушу в виде одноклеточной водоросли существенно раньше, чем считалось, а в этот промежуток времени естественный отбор поддерживал эволюцию черт, благоприятствующих наземному образу жизни. И лишь после приобретения этих инноваций предковые харофиты одновременно дали ветви распространяющихся по суше эмбриофитов и вернулись в воду, породив ныне живущий водный, но напоминающий наземное растение вид *C. braunii* (Harholt et al., 2016).

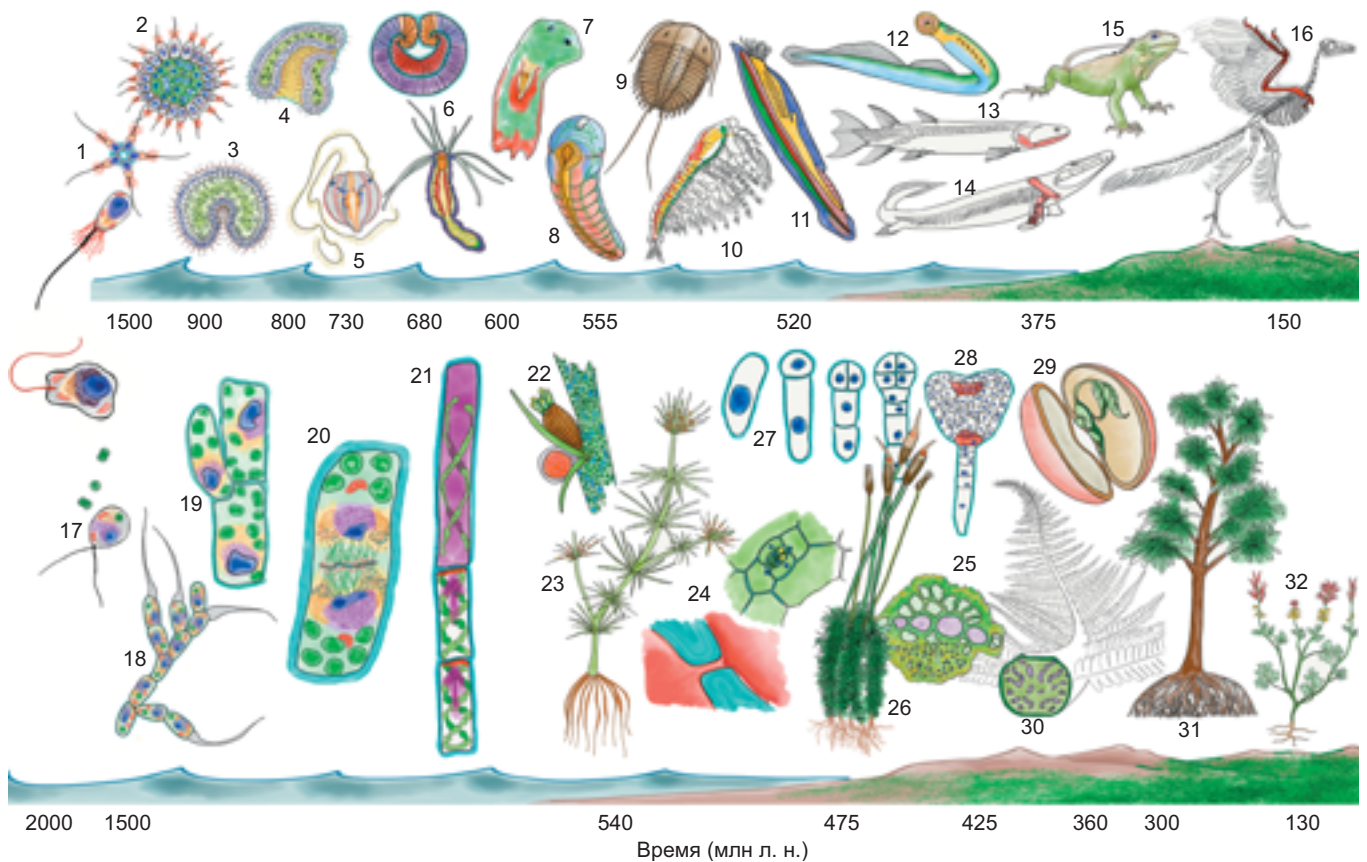


Рис. 1.25. Эволюция развития живых организмов. На схеме собраны ключевые способы адаптации развития, имевшие место на протяжении эволюционной истории животных (*сверху*) и растений (*снизу*). Растения и животные произошли от последнего общего предка эукариот (LECA) 2000 млн л. н. **Верхняя часть рисунка:** (1) Образование колоний из клеток хоанофлагеллят. (2) Развитие двуслойного организма с пролиферирующим внутренним слоем и эпителиальным фильтрующим внешним слоем. (3) С появлением более надежных соединений и внеклеточного матрикса возникают пищеварительные структуры (*неоновый синий*). (4) Появляется примитивная кишка с аборальным и оральным отверстиями, как у губки. (5) Ктенофоры, такие как этот гребневик, демонстрируют первую систему взаимосвязанных нейроподобных клеток. (6) У стрекающих, например морской анемоны, заметны первые признаки гастрюляции. (7) Возникают билатеральная симметрия (бескишечные) и сегментация (8), что дает начало многообразию линий членистоногих (9, 10). (11) Мезодерма адаптируется, создавая первое осевое производное — хорду (*красный*), что приводит к появлению Хордовых. С переходом от бесчелюстных (12, минога) к челюстноротым (13, костные рыбы) и от парных плавников к суставным передним конечностям (14, Tiktaalik), животные выходят из воды. Дальнейшая адаптация передних конечностей наземных позвоночных, рептилий (15), дает начало появлению видов птиц (16). **Нижняя часть рисунка:** (17) Эндосимбиоз с цианобактерией готовит почву для линии эволюции, в основе которой лежит фотосинтез. Модификации генов для образования внеклеточного матрикса на основе коллагена способствуют образованию нитчатых колоний водорослей (18) и более надежной защитной клеточной стенки (19, *неоновый синий*). (19) Интеграция пластидной ДНК обуславливает развитие клеток с множеством пластид. (20) Фрагмопласт выстраивает клеточную стенку в ходе цитокинеза. (21) Распространение механизмов регуляции фитогормонами открывает возможности согласования клеточного роста и морфогенеза на протяжении роста всего растения. (22, 23) Чередование поколений проявляется на примере фаз спорофита и гаметофита у ризоидных харофитовых водорослей, общих предков всех эмбриофитов. (24) Устьица и плазмодесмы закладывают фундамент будущей сосудистой системы. (25) Гидроидные клетки (*светло-фиолетовый*), транспортирующие питательные вещества, присутствуют у первых наземных растений: бриофитов (26, мох). (27) Эмбриональное развитие определяет группу эмбриофитов. (28) Плурипотентные апикальные меристемы побега и корня поставляют материал для неограниченного роста (*красный*). (29) Адаптация семени для защиты и распространения эмбрионов. (30, 31) Лигнин еще больше укрепляет клеточную стенку для повышения эффективности транспорта воды и питательных веществ — от первых сосудистых растений (30, папоротники) до самых высоких деревьев (31, хвойные). (32) Коэволюция с животными способствовала формированию огромного разнообразия покрытосеменных (цветковых растений)

РАЗДЕЛЕНИЕ ТРУДА

После выхода растений на сушу их распространению по всем наземным местам обитания способствовало разделение жизненного цикла растений на фазы спорофита и гаметофита, или **чередование поколений** (см. рис. 1.25, шаг 22). Чередование поколений стало существенным изменением в стратегии развития и положило начало эмбриогенезу растений (Benić, 2008; Kenrick, 2017). В ходе эволюции происходило непропорциональное увеличение вклада

в рост спорофита, в то время как размер гаметофита уменьшался.

ЭМБРИОН И ЕГО СЕМЕНА РАЗНООБРАЗИЯ

Разделение в ходе эволюции фаз спорофита и гаметофита заложило основу для завершения всех инноваций — появлению семени. Говоря простыми словами, семя содержит, защищает и частично питает эмбрион.

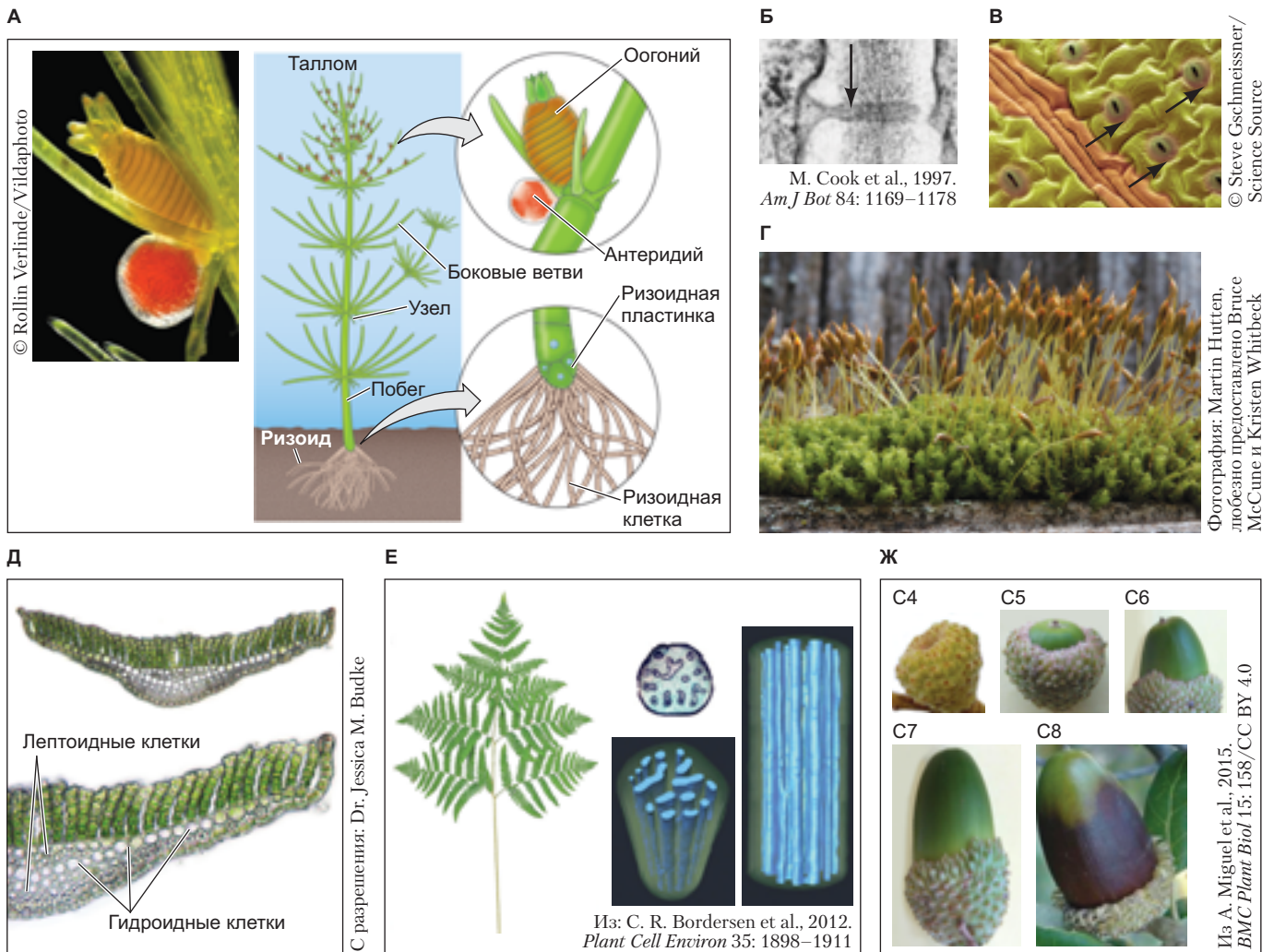


Рис. 1.26. Переходные состояния в эволюции растений. **А.** Изображение *Chara braunii*, сохранившегося вида харофитовых водорослей. Его половые органы — оогоний (яйцеклетки) и антеридий (сперматозоиды) — показаны слева, ризоиды — справа. **Б.** Трансмиссионная электронная микрофотография плазмодесм (стрелка) у харофитовой водоросли *Chara zeilanica*. **В.** Фотография устьиц (стрелки) на листе кинзы. **Г.** Представитель бриофит, мох *Dicranoweisia cirrata*, с капсулами на кончиках щетинок. **Д.** Гидроидные и лептоидные клетки. **Е.** Изображение папоротника *Pteridium aquilinum*. Справа от него находится единственный поперечный срез через область середины побега и полученная с помощью компьютерной томографии высокого разрешения объемная визуализация ксилемы в этом участке ствола в двух видах. **Ж.** Стадии развития желудя пробкового дуба (C4–C8). Обратите внимание, как чашечка «отступает» по мере увеличения околоплодника в ходе созревания семени (Рис. А из: T. Nishiyama et al., 2018. *Cell* 174: 448–464.)

Только подумайте, какая мощь сконцентрирована в желуде! Вы хороните его в земле — и он взрывается дубом! А похорони овцу — не получишь ничего, кроме гнили.

Джордж Бернард Шоу
(По данным: Linkies et al., 2010.)

Семенные растения, как хвойные, так и цветковые, занимают большую часть земной суши, что громогласно свидетельствует об огромном успехе их стратегии развития. К возникновению этой стратегии привело давление фактора отбора, с которым эмбриофиты столкнулись с момента появления: сухая почва. Жизненно важное преимущество семени состоит в физической защите, которую обеспечивает твердая семенная кожура, вкупе с периодом **остановки** развития, во время которого семя (включая и сам эмбрион) обезвоживается и остается в дремлющем состоянии, до того как условия окружающей среды станут оптимальны для прорастания и развития растения (рис. 1.26Ж). Стратегия использования семени обеспечивает сосудистые растения временем, необходимым для наступления благоприятных условий. На самом деле семена даже могут вступать в длительный период остановки развития, называемый **покоем**. Этот механизм появился в результате коэволюции с животными для обеспечения распространения семян на дальние расстояния (см. рис. 1.25, шаг 29).

Но как? Каковы механизмы процессов развития, упомянутых в этой вводной главе? Дальнейшее повествование обеспечит вас некоторыми ответами и еще большим числом вопросов, а в последней главе мы сделаем полный круг, вернувшись к обсуждению эволюции и механизмов биологии развития, лежащих в основе ключевых адаптаций, приведших к появлению тех форм жизни, которые нам известны.

Медицинская эмбриология и тератология

В то время как эмбриологи могут рассматривать эмбрионы для описания эволюции жизни и образования органов у разных животных, врачей они интересуют по причинам более практическим. От 2 до 5% детей рождаются с очевидными анатомическими аномалиями (Winter, 1996; Thorogood, 1997). Среди них: отсутствие конечностей, отсутствующие или дополнительные пальцы, расщелина неба, недоразвитие глаз, отсутствие клапанов сердца, дефекты закрытия спинного мозга и т. д. Одни пороки развития возникают из-за генных мутаций или хромосомных аномалий, другие — результат влияния факторов внешней среды, нарушающих развитие. Изучение пороков развития может подсказать, как тело человека развивается в норме. В отсутствие экспериментальных данных об эмбрионах человека «эксперименты» природы иногда дают важную информацию о том, как организовано тело человека.

Генетические аномалии и синдромы

Нарушения, обусловленные генетически (генными мутациями, хромосомными анеуплоидиями и транслокациями), называют **аномалиями**, а **синдром** — это состояние, при котором одновременно сочетаются две или более аномалии. К примеру, наследственная болезнь, известная под названием синдром Холта — Орама, передается по аутосомно-доминантному типу. У детей, рожденных с этим синдромом, обычно деформировано сердце (перегородка между правой и левой частями недоразвита) и отсутствуют кости запястья или больших пальцев. Синдром Холта — Орама вызывают мутации в гене *TBX5* (Basson et al., 1997; Li et al., 1997). Белок TBX5 экспрессируется в развивающемся сердце и кистях рук, и важен для нормального роста и дифференцировки обеих структур.

Нарушения и тератогены

Отклонения в развитии, вызванные внешними агентами (определенными химическими веществами, вирусами, радиационным излучением или повышением температуры), называют **нарушениями**. Агенты, ответственные за эти нарушения, называют **тератогенами** (в пер. с греч. — рождающий чудовищ), а науку, изучающую, как именно они нарушают нормальное развитие, — тератологией. Врожденные пороки могут быть вызваны и достаточно распространенными веществами, такими как алкоголь или ретиноевая кислота (часто используемая для лечения акне), и химическими соединениями, которые используют на производствах и выбрасывают в окружающую среду. Тяжелые металлы (например, ртуть, свинец, селен) могут нарушать развитие мозга.

В зону внимания широкой общественности тератогены попали в 1960-х гг. В 1961 г. Ленц и МакБрайд независимо друг от друга собрали свидетельства того, что препарат талидомид, назначаемый многим беременным как мягкое успокоительное, вызвал огромный рост числа случаев возникновения редкого до того времени синдрома врожденных пороков. Наиболее заметным среди них была фокомелия — состояние, при котором укорочены или отсутствуют длинные кости конечностей (**рис. 1.27А**). Более 7000 пострадавших детей родилось у женщин, принимавших талидомид, причем всего одной таблетки талидомида оказалось достаточно, чтобы ребенок родился с деформацией всех четырех конечностей (Lenz, 1962, 1966; Toms, 1962).

Среди других аномалий, вызванных этим препаратом, были пороки сердца, отсутствие наружного уха и деформация кишечника.

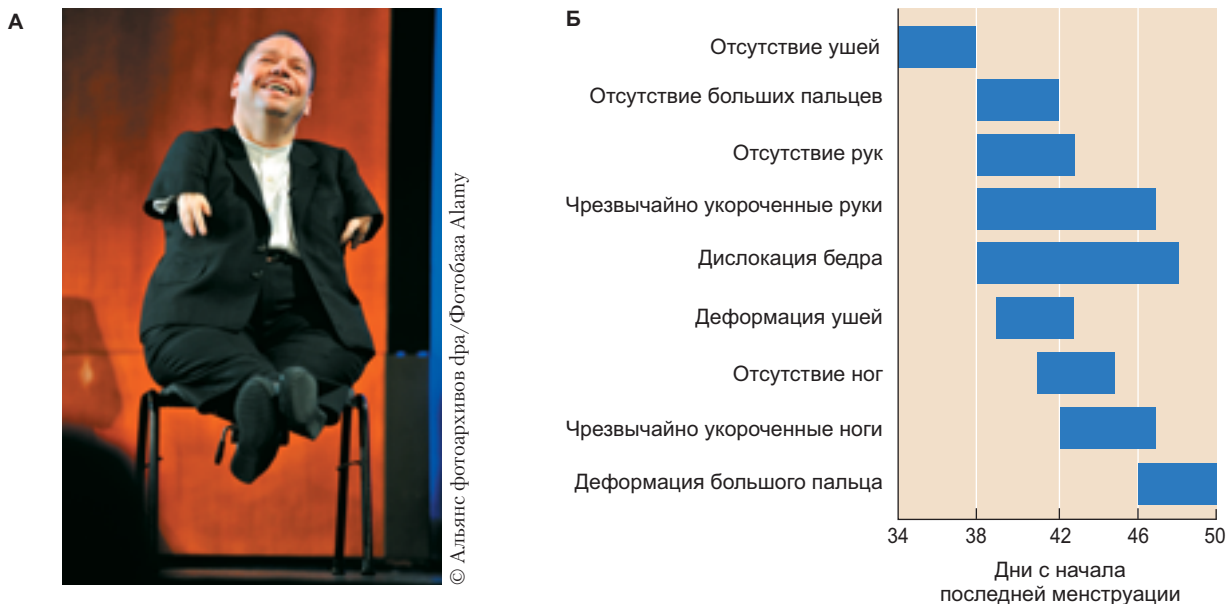


Рис. 1.27. Аномалии развития, вызванные средовым агентом. **А.** Фокомелия, нарушение нормального развития конечностей, была наиболее очевидным из врожденных пороков у детей, рожденных в начале 1960-х гг. матерями, принимавшими препарат талидомид во время беременности. Сейчас эти дети выросли и стали людьми среднего возраста; на фотографии запечатлен номинант премии Грэмми, немецкий певец Томас Квастхофф. **Б.** В определенные моменты развития человека талидомид нарушает формирование определенных структур. (Рис. Б из: E. Nowak, 1965. *Humangenetik* 1: 516–536; график по данным: N. Vargesson, 2015. *Birth Defects Res C Embryo Today* 105: 140–156 и ссылки в нем.)

Новак (Nowack, 1965) проследил период чувствительности, во время которого талидомид вызывал эти аномалии (рис. 1.27Б). Оказалось, что препарат проявляет тератогенность только при приеме между 34-м и 50-м днями с начала последней менструации (т. е. через 20–36 дней после зачатия). С 34-го по 38-й день не наблюдалось аномалий конечностей, но во время этого периода талидомид мог вызывать отсутствие или повреждение частей уха. Пороки развития верхних конечностей были обнаружены при более раннем приеме, чем в случае нижних, потому что руки развиваются немного раньше ног.

Интеграция данных о хромосомных аномалиях и новых знаний о генах, отвечающих за развитие, привела к изменениям в медицине. Интегрированные данные позволяют нам открывать гены, отвечающие за наследуемые аномалии и идентифицировать, какие именно этапы в развитии нарушаются определенными

ми тератогенами. Примеры такой интеграции вы еще не раз встретите в этом учебнике.

Послесловие

То, что все мы так или иначе связаны с прочими живыми существами, — бесспорный факт. То, как мы выглядим, как перевариваем пищу, видим, ходим и даже размножаемся, имеет эволюционное отношение ко всем другим животным и к растениям. Эта глубокая связь может и должна определять точку зрения, которая поможет в изучении биологии развития. Именно прямые настройки механизмов развития, в основном связанных с эмбриогенезом, вместе с естественным отбором создали все разнообразие жизни на Земле.



Фотография: М. J. F. Barresi
и Kathryn Lee, 2018. Благодарим
Dr. Robin Sleith за предоставление
харофитовых водорослей

О фотографии в начале главы

Это растение и правда наш кузен? На фотографии Майкл Баррези держит в руке сохранившийся вид харовых зеленых водорослей. Как вы узнали из главы, *Chara braunii* напрямую связана с общим предком всех наземных растений, и родство это уходит корнями к последнему общему предку всех эукариот (LECA) и эукариотическому происхождению животных и растений. Так что да, водоросли — наши кузены. Согласно интерактивному древу жизни EvoGenea, наше родство с зелеными водорослями уходит примерно на 2,9 млрд поколений назад. Так что в следующий раз, проходя мимо заросшего пруда, не забудьте поздороваться!

1

Коротко

Возникновение тела и области: введение в биологию развития

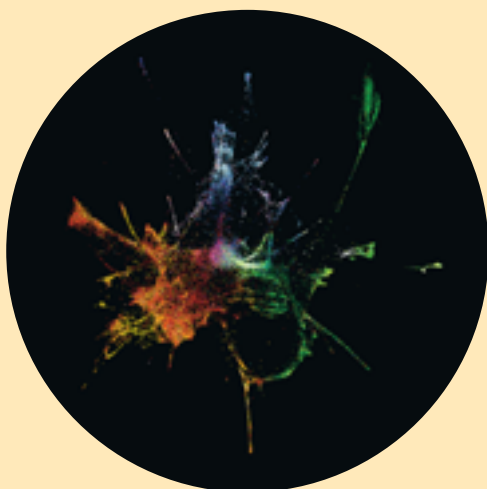
1. Жизненный цикл можно считать центральной единицей в биологии; не следует ставить во главу угла взрослую форму. Базовый жизненный цикл животного состоит из оплодотворения, дробления, гастрюляции, образования зародышевых листков, органогенеза, метаморфоза, взрослой стадии и старения. Базовый жизненный цикл цветкового (покрытосеменного) растения состоит из репродуктивной и гаметофитной фаз, эмбриогенеза и созревания семени, ювенильной и зрелой вегетативных фаз.
2. Три зародышевых листка животных дают начало определенным системам органов. Из эктодермы формируются эпидермис, нервная система и пигментные клетки; мезодерма порождает почки, гонады, мышцы, кости, сердце и клетки крови; энтодерма образует выстилку пищеварительного тракта и дыхательной системы.
3. Помечая клетки с помощью красителей или генетических инструментов, можно наблюдать, что некоторые клетки дифференцируются там же, где образовались, в то время как другие мигрируют из начального положения и дифференцируются на новом месте. К мигрирующим клеткам относятся клетки нервного гребня или предшественники половых клеток и клеток крови.
4. Из-за жестких клеточных стенок растительные клетки не мигрируют, а для формирования эмбриона и взрослого растения они используют направленные деление и рост клеток.
5. Апикальные меристемы побега и корня содержат пулы стволовых клеток, обеспечивающие образование корня и побегов в течение всей жизни растения.
6. «Общность эмбриональных структур выявляет общность происхождения» (Чарльз Дарвин «О происхождении видов...»).
7. Принципы Карла фон Бэра гласят, что общие черты большой группы животных появляются в эмбрионе раньше, чем специализированные признаки меньших групп. По мере развития эмбрион данного вида все дальше отдалается от взрослых форм других видов. Ранний эмбрион «высших» животных не похож на взрослых представителей «низших» животных.
8. Гомологичные структуры у разных видов — это те, чье сходство определено происхождением от одной и той же предковой структуры. Аналогичные структуры — это те, чье сходство обусловлено выполнением сходных функций (при отсутствии общей предковой структуры).
9. Эволюционная история жизни на Земле — это история адаптаций, имевших место в процессах развития и стоящих за признаками животных и растений. Ключевые переходные морфологии как у растений, так и у животных демонстрируют общность эволюции их развития.
10. Хоанофлагелляты и харофитовые водоросли являются общими предками соответственно всех многоклеточных животных и всех наземных растений (эмбриофитов).
11. Пороки развития могут быть вызваны генетическими факторами (мутациями, анеуплоидиями, транслокациями) или средовыми агентами (определенными химическими веществами и вирусами, радиацией).
12. Тератогены — вещества в окружающей среде, способные нарушать развитие, — действуют в определенные моменты, когда формируются те или иные органы.

Определение идентичности:

механизмы разметки тела в развитии

2

Можно ли картировать развитие?



С разрешения: Dan Wagner, Sean Megason
и Allon Klein

В 1883 г. один из первых эмбриологов Америки Уильям Кит Брукс рассуждал о «величайшем из всех чудес материальной вселенной: существовании в простом, неорганизованном яйце силы, создающей из него определенное взрослое животное». Он отмечал, что этот процесс столь сложен, что «возникает резонный вопрос, смеем ли мы надеяться когда-либо найти к нему ключ, постигнуть его истинный смысл, скрытые законы и причины». Действительно, путь от «простого неорганизованного яйца» к совершенной упорядоченности тела — одна из фундаментальных загадок развития. Сегодняшние биологи по кусочкам собирают «скрытые законы и причины». В их числе организация исходно неорганизованного яйца, различная интерпретация одного и того же генома разными клетками, слаженный хор различных режимов межклеточной коммуникации, управляющий дифференцировкой клеток.

В этой главе мы введем понятие *спецификации клеток*, т. е. присвоения клеткам определенной судьбы, и познакомимся с тем, какие механизмы используют отдельные организмы для определения пути развития клетки. В главах 3 и 4 мы еще больше погрузимся в генетические механизмы, опосредующие клеточную дифференцировку, и вовлеченные в этот процесс сигнальные пути. Глава 5 будет посвящена развитию стволовых клеток, которые служат хорошей иллюстрацией всех принципов, определенных в этой части.

Уровни коммитирования

Невооруженному взгляду отдельные песчинки на обширном пляже представляются неорганизованными, однако они могут быть собраны вме-

сте в сложные структуры, примером чему служит этот песчаный осьминог, держащий своими щупальцами детей (**рис. 2.1**). Как неупорядоченные частицы приходят к порядку, куча песка становится скульптурой, а группа клеток — сложным эмбрионом? Знали ли частицы песка, оказавшиеся в глазу скульптуры осьминога, что станут глазом, когда их вымыло на берег чуть ранее тем же утром? Очевидно, требуется приложить значительное количество энергии, чтобы слепить из этих неорганических неодушевленных частиц глаз, но как насчет клеток настоящего глаза? Знали ли они, что им суждено внести вклад в построение сетчатки, роговицы или хрусталика? Если да, на каком этапе они узнают об этом и насколько твердо следуют этой траектории развития?

Дифференцировка клеток

Образование специализированных типов клеток называют дифференцировкой; в ходе этого процесса клетка прекращает деление и приобретает специализированные структурные элементы и особые свойства — уникальные клеточные черты. Красная клетка крови очевидным образом радикально отличается по составу белков и клеточному строению от нейрона в мозге. Биохимические и функциональные различия между ними предваряет процесс присвоения каждой клетке определенного клеточного статуса. В ходе **коммитирования** клетка может не отличаться на вид ни от ближайших соседей, ни от самых отдаленных клеток эмбриона и не демонстрировать ни малейших видимых признаков дифференцировки, но ее путь развития программируемо ограничивается.



© Michael J. F. Barresi, 2014

Рис. 2.1. От крупинки песка к организованной структуре осьминога

Созревание согласно траектории развития клетки

Процесс присвоения клетке определенного типа можно разделить на две стадии: стадию **спецификации** (определения) и стадию **детерминации** (Harrison, 1933; Slack, 1991). Считается, что путь развития клеток или тканей **определен**, если клетки способны дифференцироваться автономно (т. е. самостоятельно) при помещении в среду, нейтральную в плане вы-

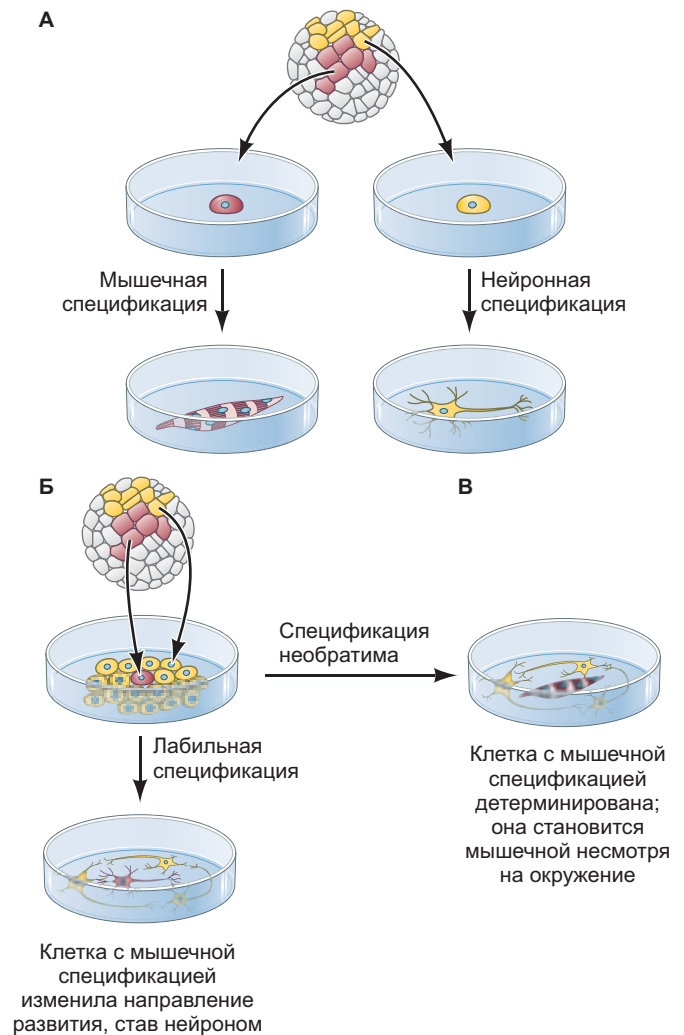


Рис. 2.2. Клеточная детерминация. **А.** Две клетки, по-разному расположенные в бластуле, специфицированы в мышечном или нейронном направлении, и становятся определенными клетками мышц или нейронами, будучи изолированы. **Б, В.** Две различные клетки бластулы совмещены в культуре. **Б.** В одном сценарии темно-красная клетка специфицирована — но не детерминирована — в мышечном направлении. Взаимодействуя с соседями, она проходит нейрональную дифференцировку. **В.** Если темно-красная клетка коммитирована и детерминирована в мышечном направлении к моменту начала культивирования, она продолжит мышечную дифференцировку вне зависимости от взаимодействия с соседними клетками

бора траектории развития, например в чашку Петри (рис. 2.2А). На стадии спецификации определение клеточного типа еще лабально (т. е. может быть изменено). Если такую клетку подсадить к популяции клеток с иной спецификацией, траектория развития пересаженной клетки изменится в ходе ее взаимодействия с новыми соседями (рис. 2.2Б). Их можно сравнить со студентами, которые пришли на занятие по биологии развития, интересуясь химией, но, поняв, насколько это потрясающая штука, сменили область и стали биологами развития!

Считается, что клетки или ткани **детерминированы**, если способны дифференцироваться автономно, даже будучи помещенными в другое место зародыша или в чашку Петри с группой клеток другой спецификации (рис. 2.2В). Если даже в таких обстоятельствах клетка или ткань способна дифференцироваться в соответствии с определенным путем развития, предполагается, что приверженность этой траектории необратима. Как если бы студент твердо решил остаться химиком, каким бы впечатляющим не оказался курс биологии развития.

Таким образом, в ходе эмбриогенеза недифференцированные клетки созревают, проходя определенные стадии, постепенно определяющие их путь развития: вначале спецификацию, затем детерминацию, и, наконец, дифференцировку. В эмбрионе может проявляться три режима спецификации: автономная, условная и синцитиальная. Эмбрионы разных видов используют определенные сочетания этих трех режимов.

Автономная спецификация

Один из режимов присвоения траектории развития клеткам — **автономная спецификация**. В этом случае blastomeres раннего эмбриона достается набор ре-

шающих факторов развития из цитоплазмы ооцита — так называемых **цитоплазматических детерминант**. Другими словами, цитоплазма ооцита не гомогенна; различные области ооцита содержат разные факторы определения траектории развития клетки (это молекулы, зачастую транскрипционные факторы), которые регулируют экспрессию генов таким образом, что направляют клетку по конкретному пути созревания. В случае автономной спецификации клетка очень рано «узнает», чем станет, без взаимодействия с окружающими клетками. К примеру, даже на очень ранних стадиях развития брюхоногого моллюска *Patella* blastomeres презумптивного трофобласта можно изолировать в чашке Петри. Там они развиваются в такие же реснитчатые клетки, которые из них образовались бы в зародыше, причем точно в те же сроки (рис. 2.3). Продолжительная приверженность пути развития трофобласта указывает на то, что конкретные ранние blastomeres уже специфицированы и детерминированы в данном направлении.

Цитоплазматические детерминанты и автономная спецификация у оболочника

Спецификация клеток — динамический процесс, происходящий в ходе эмбриогенеза; в связи с этим важнейшую роль в изучении дифференцировки клеток сыграла возможность проводить эксперименты по прослеживанию **клеточных линий** — прослеживанию процессов клеточного созревания во времени. Можно пометить группы эмбриональных клеток, чтобы увидеть, во что они превратятся во взрослом организме. Такие исследования способствуют созданию **карты презумптивных зачатков** — схемы, «отображающей» структуры личинки или взрослой особи в области эмбриона, из которых эти структуры

Нормальное развития *Patella*

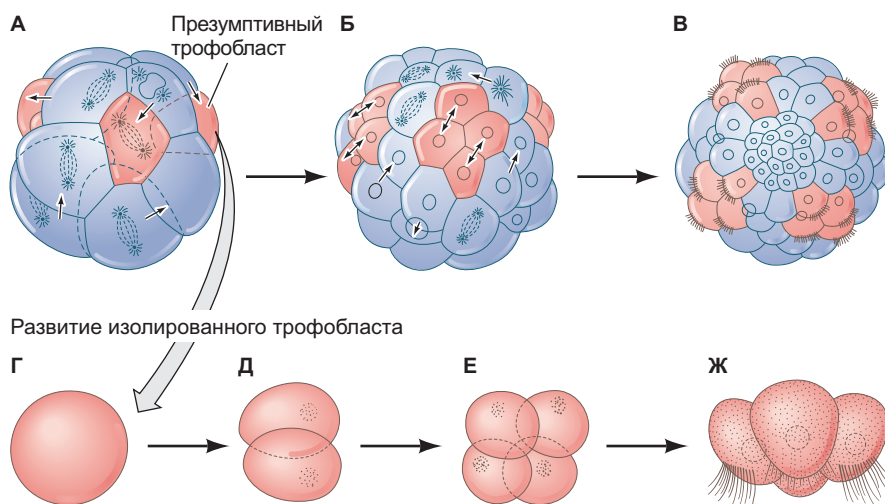


Рис. 2.3. Автономная спецификация. А–В. Дифференцировка реснитчатых клеток трофобласта у моллюска *Patella*. А. Вид сбоку на стадии 16 клеток; клетки презумптивного трофобласта выделены розовым. Б. Стадия 48 клеток. В. Стадия личинки с ресничками. Г–Ж. Дифференцировка клеток трофобласта *Patella*, изолированных на стадии 16 клеток и культивированных *in vitro*. Даже после изоляции в культуре клетки делятся и формируют реснички в правильное время. (По данным: Е.В. Wilson, 1904. *J Exp Zool* 1: 1–72.)

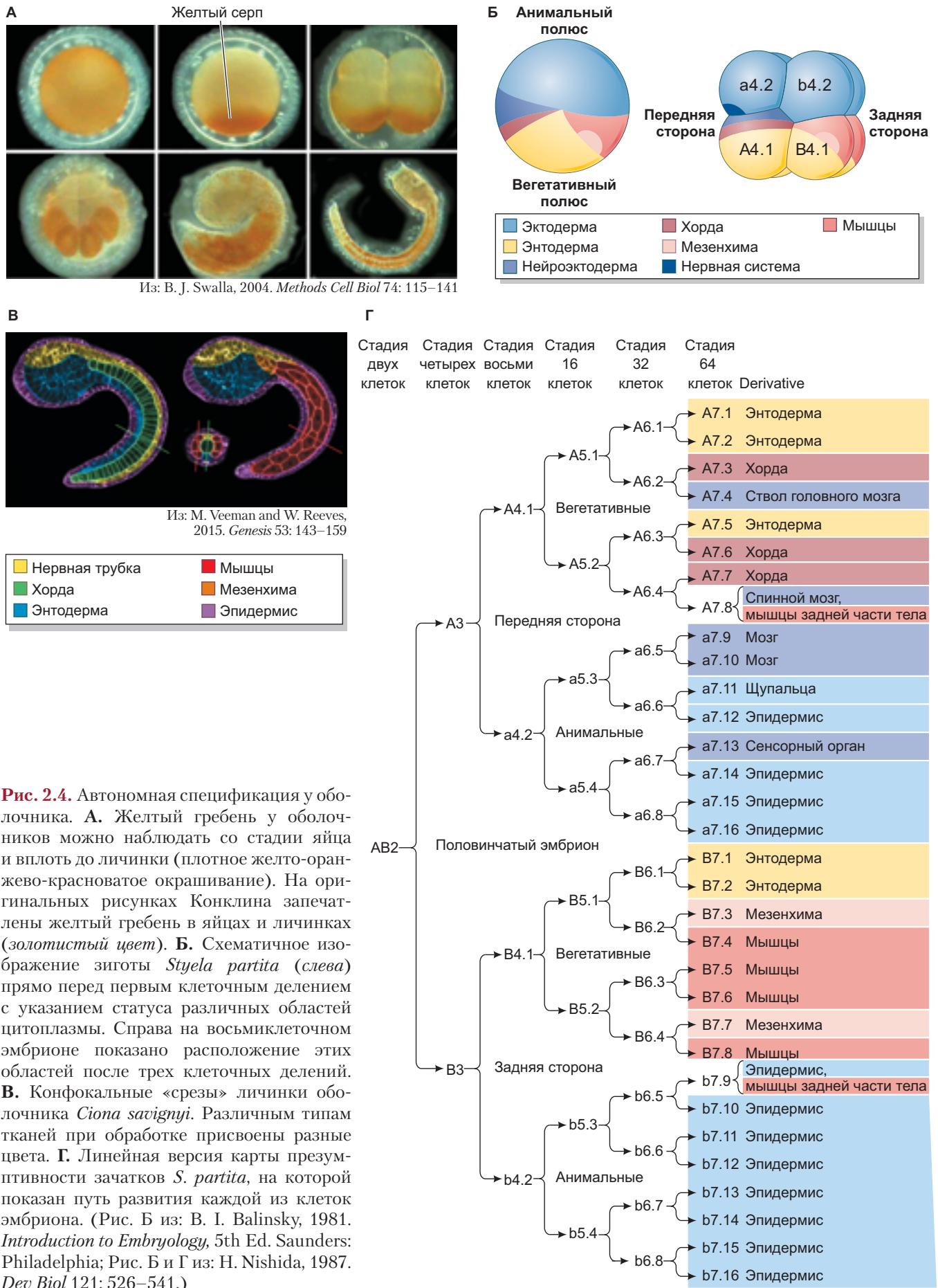


Рис. 2.4. Автономная спецификация у оболочника. **А.** Желтый гребень у оболочников можно наблюдать со стадии яйца и вплоть до личинки (плотное желто-оранжево-красноватое окрашивание). На оригинальных рисунках Конклина запечатлены желтый гребень в яйцах и личинках (*золотистый цвет*). **Б.** Схематичное изображение зиготы *Styela partita* (слева) прямо перед первым клеточным делением с указанием статуса различных областей цитоплазмы. Справа на восьмиклеточном эмбрионе показано расположение этих областей после трех клеточных делений. **В.** Конфокальные «срезы» личинки оболочника *Ciona savignyi*. Различным типам тканей при обработке присвоены разные цвета. **Г.** Линейная версия карты презумптивности зачатков *S. partita*, на которой показан путь развития каждой из клеток эмбриона. (Рис. Б из: V. I. Balinsky, 1981. *Introduction to Embryology*, 5th Ed. Saunders: Philadelphia; Рис. Б и Г из: H. Nishida, 1987. *Dev Biol* 121: 526–541.)

возникают. Одна из первых созданных карт презумптивных зачатков была основана на тщательных наблюдениях за эмбрионами оболочника (асцидии).

В 1905 г. эмбриолог Эдвин Грант Конклин, работавший в морской биологической лаборатории Вудс-Хоул, опубликовал замечательную карту презумптивных зачатков асцидии *Styela partita*¹. Конклин заметил желтое окрашивание, асимметрично распределенное в цитоплазме ооцита (цветную область, позднее названную «желтым серпом») и в конечном счете оказывающееся в мышечных клетках асцидии (рис. 2.4). Использование желтого пигмента предоставило Конклину удобный способ отслеживать потомков каждого бластомера. Наблюдая путь развития каждой из ранних клеток, Конклин показал, что «все основные органы личинки в их конечных положениях и пропорциях заданы уже на стадии двух клеток различными типами протоплазмы»². Но является ли каждый бластомер детерминированным к своей линии развития, т. е. обладает ли каждый автономной спецификацией?

Клетки, образующие мышцы эмбриона *Styela*, всегда сохраняют желтое окрашивание, и их происхождение можно легко проследить до области цитоплазмы в бластомерах B4.1. Удаление клеток B4.1 приводит к развитию личинки без мышц хвоста (Reverberi and Minganti, 1946). Эти результаты подкрепляют вывод о том, что *только клетки, происходящие из ранних бластомеров B4.1, обладают способностью развиваться в хвостовые мышцы*. В пользу автономной спецификации говорит и то, что каждый бластомер образует большую часть соответствующих ему клеточных типов, даже будучи отделен от остального эмбриона (рис. 2.5). Примечательно, что перенос желтой цитоплазмы из клеток B4.1 в другие клетки приводит к образованию из последних мышц хвоста (Whittaker, 1973; Nishida and Sawada, 2001). Вместе взятые, эти результаты указывают на то, что в цитоплазме ранних бластомеров присутствуют и дифференциально распределены факторы, играющие решающую роль в определении клеточного развития.

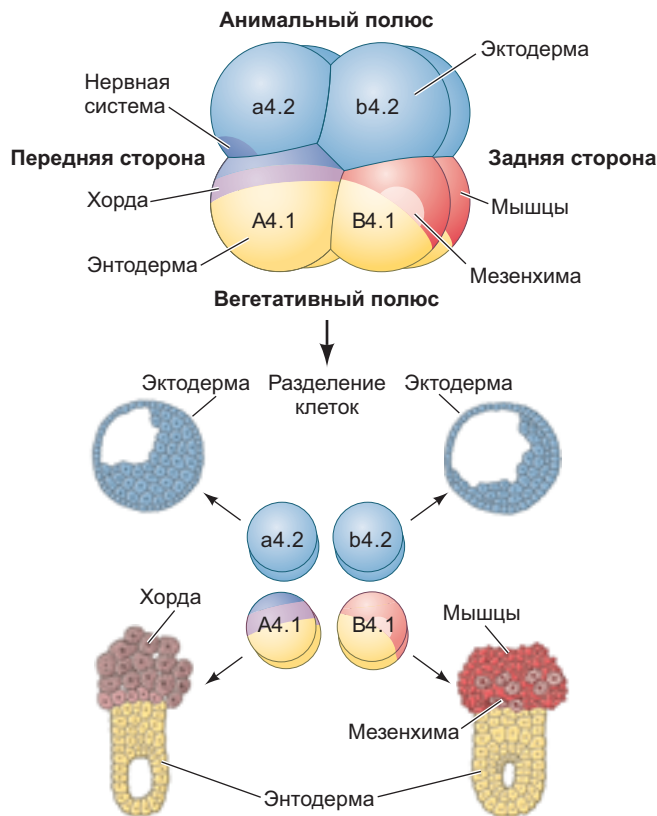


Рис. 2.5. Автономная спецификация в раннем эмбрионе оболочника. При диссоциации четырех пар бластомеров восьмиклеточного эмбриона каждая из них формирует структуры, которые образовала бы, оставшись в целом эмбрионе. Однако нервная система оболочников проходит условную спецификацию. Карта презумптивных зачатков демонстрирует, что левая и правая части эмбриона оболочника дают начало одинаковым клеточным линиям. Здесь образующая мышцы желтая цитоплазма изображена красным, согласно стандартному способу изображения мезодермы, к которой она относится. (По данным: G. Reverberi and A. Minganti, 1946. *Pubbl Staz Zool Napoli* 20: 199–252.)

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ПОЧЕМУ ЖЕЛТЫЙ — ЦВЕТ Macho

В 1973 г. Дж. Р. Уиттакер получил замечательное биохимическое подтверждение цитоплазматической сегрегации тканевых детерминант в ранних зародышах оболочников. Более поздние исследования показали, что в желтой цитоплазме содержится мРНК специфичного для мышц транскрипционного фактора под названием «Macho». Только те бластомеры, которые получают цитоплазму из этой области (а значит, и Macho), дают начало мышечным клеткам (рис. 2.6А; Nishida and Sawada, 2001; reviewed by Pourquié, 2001). Функционирование Macho необходимо для развития мышц в хвосте *Styela*; утрата мРНК *macho* приводит к утрате бластомерами B4.1 способности к мышечной

¹ На сегодняшний день обычным для исследователей оболочником является *Ciona intestinalis*, благодаря которому было получено представление о созревании клеточных линий, эволюции и развитии позвоночных. Недавние исследования этого вида выявили физические факторы, определяющие закрытие нервной трубки, которое происходит у него, как у позвоночных.

² Конклин фиксировал и окрашивал каждое деление в эмбрионе, и в его статье 1905 г. задокументирована эта последовательность. Все исследование было выполнено с единственным предметным стеклом. На нем он совместил эмбрионы всех стадий, залив их в бальзам и окрасив. Далее он зарисовал увиденное, и получившиеся рисунки стали литографиями в статье. То самое стекло все еще существует — в коллекции Университета Северной Каролины.

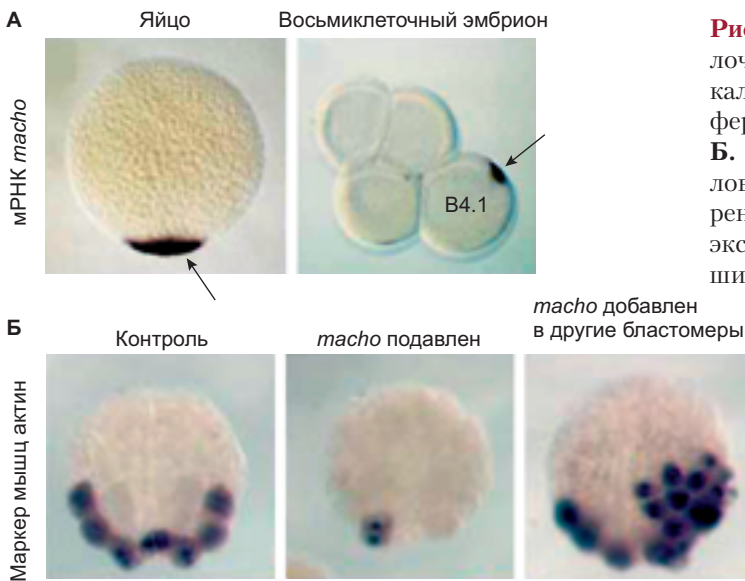


Рис. 2.6. Ген *macho* регулирует развитие мышц у оболочников. **А.** Как и желтый серп, транскрипт *macho* локализован в наиболее вегетативной части яйца и дифференциально экспрессируется лишь в бластомере B4.1. **Б.** Нокадаун функции *macho* путем введения антисмысловых олигонуклеотидов подавляет мышечную дифференцировку, в то время как искусственная эктопическая экспрессия *macho* в других бластомерах приводит к расширению зоны мышечной дифференцировки

Все рис. из: H. Nishida and K. Sawada, 2001. *Nature* 409: 724–729

дифференцировке, в то время как микроинъекция мРНК *macho* в другие бластомеры способствует эктопической мышечной дифференцировке (рис. 2.6Б). Таким образом, мышцы хвоста у оболочников образуются автономно за счет получения и сохранения мРНК *macho* из цитоплазмы ооцита в каждом цикле митоза.

? Загадки развития

Посмотрите внимательно на локализацию мРНК *macho* в эмбрионе оболочника (см. рис. 2.6А). Распределена она по клетке равномерно или же сосредоточена в небольшой области? Определившись с пространственным распределением мРНК, подумайте, насколько оно согласуется с автономным режимом спецификации мышечных клеток. С точки зрения биологии клетки как, по-вашему, устанавливается распределение конкретной мРНК?

Условная спецификация

Мы только что узнали, как в ходе автономной спецификации определяется путь развития большинства клеток в раннем эмбрионе оболочников. Однако даже такой эмбрион не ограничивается одним режимом, его нервная система возникает путем условной спецификации. **Условная спецификация** — это процесс, в ходе которого клетки достигают соответствующего клеточного статуса посредством взаимодействия с другими клетками. Взаимодействия могут осуществляться через межклеточные контакты (юстакринные факторы), секретируемые сигналы (паракринные факторы) и физические свойства локальной среды (механические напряжения); все эти механизмы мы рассмотрим подробнее в гл. 4. Условная спецификация зависит от условий. Например, при пересадке клетки из одной области бластулы позвоночных, которая была картирована как дающая начало дорсальным структурам, в презумптив-

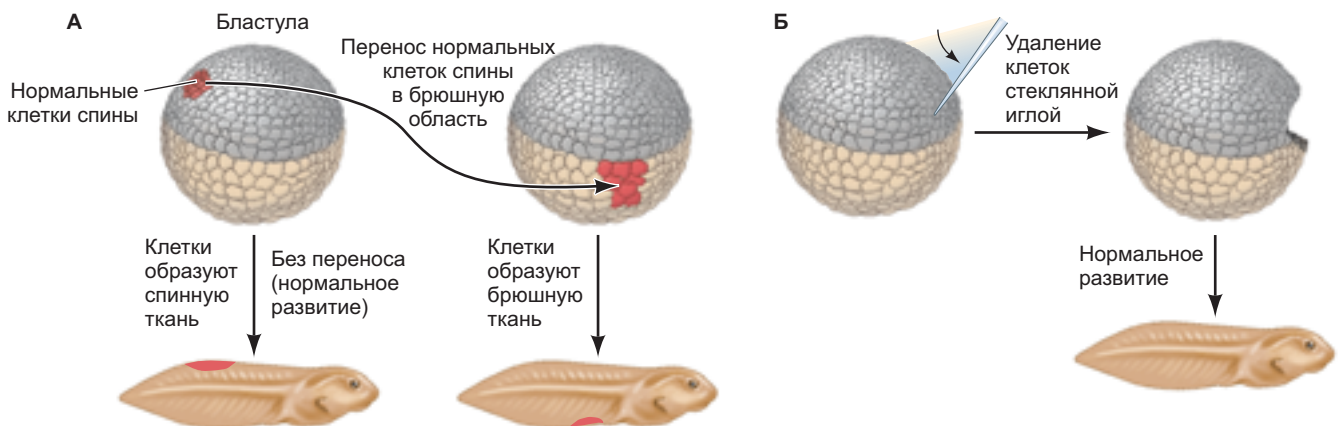


Рис. 2.7. Условная спецификация. **А.** Чем станет данная клетка, зависит от ее положения в эмбрионе. Ее статус определяет взаимодействие с соседними клетками. **Б.** Если удалить клетки из эмбриона, оставшиеся компенсируют утрату

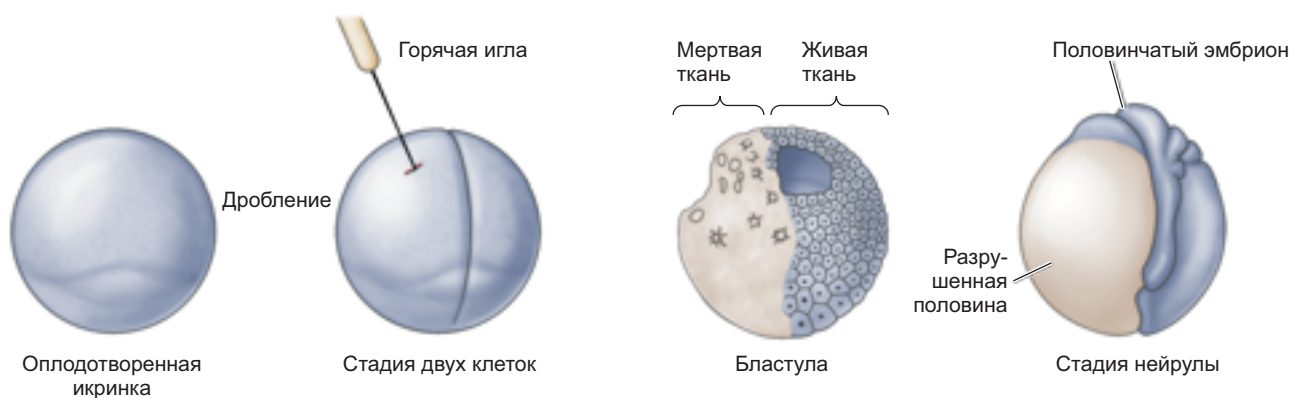


Рис. 2.8. Попытки Ру продемонстрировать автономную спецификацию. Разрушение (без удаления) одной из клеток двухклеточного эмбриона лягушки приводило к развитию лишь половины эмбриона

ную вентральную область другого эмбриона клетки «донора» сменяют свою линию развития и образуют вентральные клеточные типы (**рис. 2.7**). Более того, дорсальная область эмбриона-донора, из которой выделились клетки, в итоге также будет развиваться нормальным образом.

РОЛЬ ПОЛОЖЕНИЯ КЛЕТКИ: УСЛОВНАЯ СПЕЦИФИКАЦИЯ В ЭМБРИОНЕ МОРСКОГО ЕЖА

Еще в далеком 1888 г. Август Вейсман предположил, что каждая клетка эмбриона развивается автономно за счет детерминант, отсутствующих в других клетках. Это была проверяемая гипотеза. Основываясь на карте презумптивных зачатков эмбриона лягушки, Вейсман заявил, что первое деление, разделяющее будущие правую и левую половины эмбриона, разделяет также «правые» и «левые» детерминанты между образующимися бластомерами. Вильгельм Ру проверил гипотезу Вейсмана, убив с помощью горячей иглы одну из клеток двухклеточного эмбриона лягушки, в результате чего развивалась только правая или только левая часть личинки (**рис. 2.8**). На основании своих результатов Ру объявил, что имеет место автономная спецификация, а все инструкции для нормального развития присутствуют внутри каждой клетки.

Несмотря на это, коллега Ру, Ганс Дриш, получил противоположные результаты в экспериментах по изолированию (**рис. 2.9**). От отделял бластомеры морского ежа друг от друга интенсивным встряхиванием (а позже помещением в бескальциевый раствор). К удивлению Дриша, каждый бластомер двухклеточного эмбриона развивался в полноценную личинку. Аналогичным образом, когда Дриш разделял четырех- и восьмиклеточные эмбрионы, часть изолированных клеток давала полноценные, билатерально симметричные свободноплавающие личинки, известные как **плутеусы**. Налицо были результаты,

радикально расходящиеся с выводами Вейсмана и Ру. Вместо того чтобы независимо дифференцироваться в соответствующую часть будущего эмбриона, каждый из изолированных бластомеров регулировал собственное развитие с образованием полноценного организма. В этих опытах были получены первые наглядные экспериментальные свидетельства того, что линия развития клетки зависит от статуса ее соседей. Впоследствии Дриш экспериментально удалял клетки из эмбриона, что в свою очередь меняло контекст оставшихся в нем клеток (они теперь контактировали с новыми соседями). В результате все клеточные пути развития корректировались, благодаря чему поддерживалось полноценное эмбриональное развитие. Другими словами, клеточные пути менялись, подстраиваясь под *условия*. При условной спецификации пути развития клеток определяют взаимодействия между клетками, а не какие-либо цитоплазматические факторы, свойственные определенному типу клеток.

Последствия этих экспериментов были значимы как для эмбриологии, так и лично для Дриша¹. Во-первых, Дриш показал, что проспективные потенции изолированного бластомера (т. е. набор клеточных типов, которые он может дать) шире, чем его проспективное значение (набор клеточных типов, которым он дает начало в ходе нормального развития). Согласно Вейсману и Ру, проспективные потенции и проспективное значение бластомера должны были быть идентичными. Во-вторых, Дриш заключил, что эмбрион морского ежа «есть гармоничная эквипотенциальная система», поскольку его потенциально независимые части взаимодействуют с образованием

¹ Идея эквивалентности ядер и способности клеток к взаимодействию в итоге вынудила Дриша уйти из науки. Дриш, считавший эмбрион подобным механизму, не мог объяснить, как тот может восполнять отсутствующие части или как клетка может менять свой статус, превращаясь в клетку другого типа.

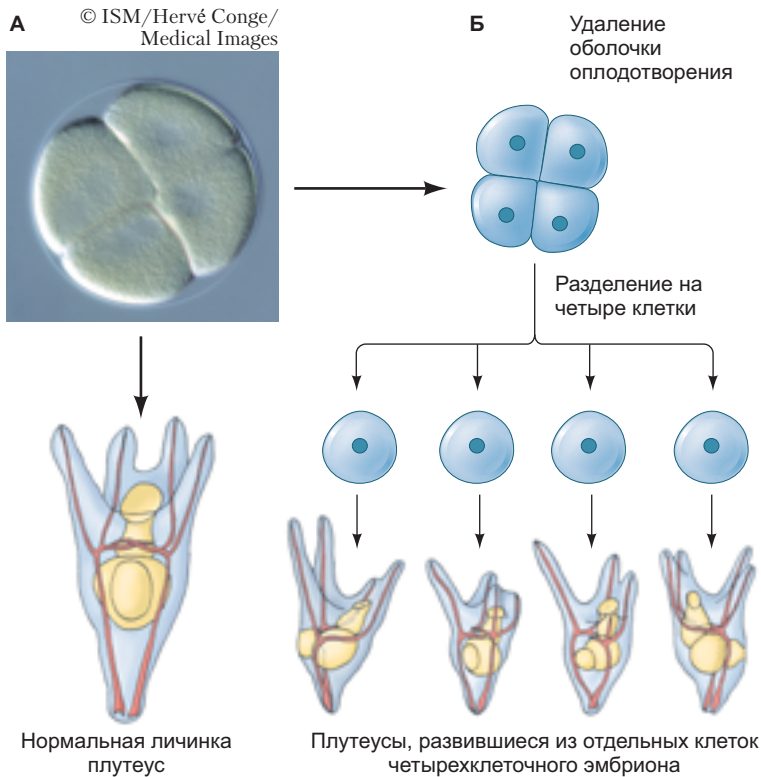


Рис. 2.9. Демонстрация условной спецификации в опыте Дриша. **А.** Из intactного четырехклеточного эмбриона морского ежа развивается нормальная личинка плутеус. **Б.** Если удалить четырехклеточный эмбрион из оболочки оплодотворения и изолировать составляющие его четыре клетки, каждая из них образует маленькую, но нормальную по строению личинку плутеус. (Все личинки изображены в одном масштабе.) Заметьте, что четыре сформировавшиеся таким способом личинки не идентичны, хотя каждая из них способна образовывать все необходимые типы тканей. Схожую изменчивость можно наблюдать и у взрослых морских ежей, появившихся таким образом (Marcus, 1979). (Рис. Б по данным: A. Hörstadius and A. Wolsky, 1936. *Archiv f Entwicklungsmechanik* 135: 69–113.)

единого организма. Эксперимент Дриша подразумевает, что *взаимодействия между клетками принципиально важны для нормального развития*. Более того, раз каждый из ранних бластомеров может, будучи изолированным, образовать все клетки эмбриона, следовательно, в ходе нормального развития сообщество клеток должно его в этом ограничивать (Hamburger, 1997). В-третьих, Дриш заключил, что путь развития ядра зависит исключительно от его положения в эмбрионе (см. сноску на с. 65).

Теперь мы знаем (и увидим в гл. 10 и 11), что морские ежи, как и лягушки, используют и автономную, и условную спецификацию ранних эмбриональных клеток. Более того, для обеих групп животных характерен схожий режим раннего развития и даже похожие молекулы. В 16-клеточном эмбрионе морского ежа группа клеток, называемая микромерами, наследует из цитоплазмы ооцита набор транскрипционных факторов. Под действием транскрипционных факторов микромеры автономно развиваются в скелет личинки, однако те же самые факторы активируют гены паракринных и юстакринных сигналов, которые затем секретируются микромерами и вызывают условную спецификацию окружающих их клеток.

Про эмбрионы (в особенности эмбрионы позвоночных), в которых большинство бластомеров проходят условную спецификацию, традиционно говорят, что для них характерна эмбриональная регуляция. Но чем больше мы узнаем о том, как используются в каждом эмбрионе автономная и условная спецификации, тем менее устойчивыми кажутся по-

нятия «мозаичного» и «регуляционного» развития. На самом деле попытки избавиться от этих определений делал еще эмбриолог Эдмунд Б. Уилсон (1894, 1904) больше века назад.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

С какой стороны посмотреть: спецификация в эмбрионе растения

Режимы клеточной спецификации у растений подвержены тем же законам, что и у животных. Самый яркий пример автономной спецификации у растений имеет место в ходе первого деления зиготы. Перед первым делением цитоплазма зиготы разделяется асимметрично — и качественно, и количественно, вследствие чего после цитокинеза формируется структура, известная как **предзародыш**, или **проэмбрион** (рис. 2.10А). В ходе этого деления устанавливается апикально-базальная ось эмбриона и в дальнейшем всего растения. Меньшая из дочерних клеток проэмбриона (апикальная) дает начало всем частям собственно растения, кроме кончика корня. Противоположная ей базальная дочерняя клетка проэмбриона образует кончик корня и **подвесок**, который служит для соединения эмбриона растения с питательными веществами, накопленными в окружающей его ткани семени.

Отвечая обязательному критерию автономной спецификации, и апикальная, и базальная клетки

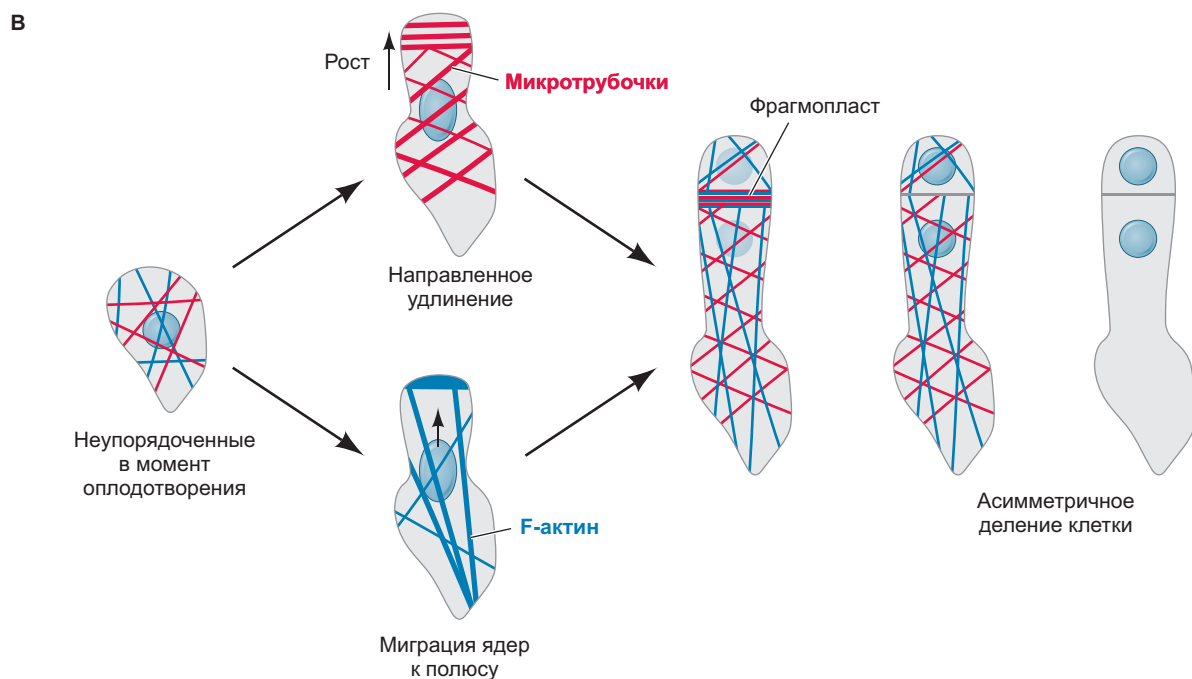
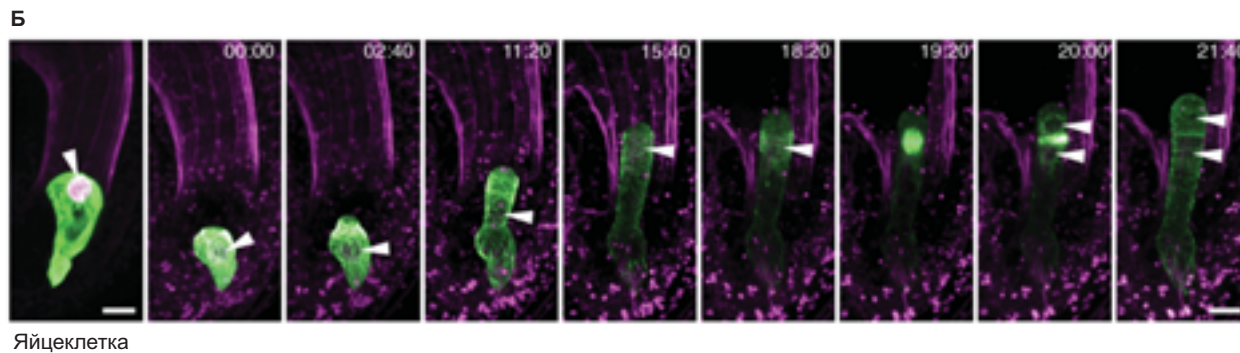
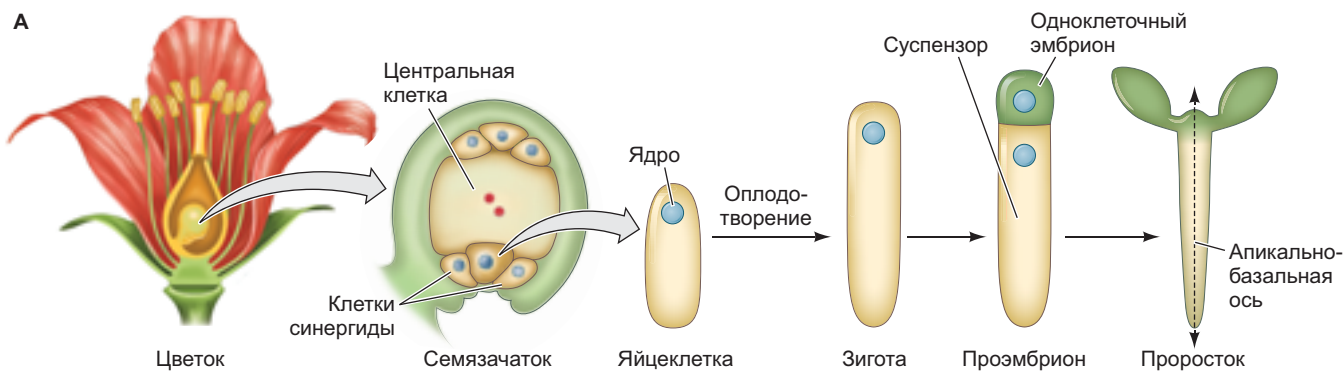


Рис. 2.10. Спецификация путем асимметричного деления. **А.** Схема первого деления у *Arabidopsis thaliana*, устанавливающего апикально-базальную ось эмбриона. **Б.** Цейтраферная съемка асимметричного деления зиготы с образованием проэмбриона. На этих изображениях микротрубочки показаны зеленым цветом, а ядра — фиолетовым. Положение ядер отмечено белыми треугольниками. На каждом кадре проставлено соответствующее ему время после оплодотворения (в формате часы : минуты). Масштабный отрезок = 10 мкм. **В.** Схема, демонстрирующая некоторые ключевые этапы перестройки цитоскелета, за счет которых происходят удлинение клеток, перемещение ядер и, наконец, цитокинез. Ориентация актиновых филаментов показана синим цветом, а микротрубочек — красным. (По данным: Y. Kimata et al., 2016. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 14157–14162 and ITbM, Nagoya University.)

проэмбриона придерживаются своих траекторий развития в эмбрион и подвесок соответственно, даже будучи изолированными *in vitro* или *in vivo* (Qu et al., 2017). Структуры цитоскелета, представленные микротрубочками и актиновыми микрофиламентами, вначале удлинняют зиготу, затем перемещают ее ядро к будущей апикальной стороне клетки и, наконец, устанавливают положение препрофазной ленты и далее, в ходе цитокинеза, фрагмента (рис. 2.10Б, В; Pillitteri et al., 2016). По окончании этой ранней и кратковременной фазы автономной спецификации развитие клеток растений следует по пути условной спецификации. На протяжении всего дальнейшего развития растения принадлежность клеток к тому или иному типу чрезвычайно сильно зависит от положения клетки вдоль апикально-базальной оси растения. Таким образом, первое асимметричное деление зиготы задает у эмбрионитов географию по апикально-базальной оси, что достигается путем перемещения сигнальных факторов, определяющих развитие клеток. В гл. 4 мы обсудим, что полярный транспорт фитогормонов, таких как ауксин и цитокинины, вдоль этой и других осей дифференциально регулирует экспрессию генов и впоследствии определяет принадлежность клеток к различным клеточным типам на основании их положения в растении.

Синцитиальная спецификация

Третий режим спецификации использует элементы как автономной, так и условной спецификации. **Синцитием**¹ называют цитоплазму, содержащую много ядер; спецификацию презумптивных клеток в составе синцития называют **синцитиальной спецификацией**. Замечательным примером эмбрионального развития со стадией синцития служат насекомые, что можно проиллюстрировать на плодовой мушке *Drosophila melanogaster*. Во время ранних стадий дробления у мушки ядра делятся 13 раз без разделения цитоплазмы. Эти деления создают эмбрион с большим числом ядер, заключенных в общей цитоплазме и окруженных общей клеточной мембраной. Такой эмбрион носит название синцитиальной бластодермы (рис. 2.11).

В пределах синцитиальной бластодермы *идентичность* будущих клеток устанавливается одновременно вдоль передне-задней оси всего эмбриона. Таким образом, установление клеточной идентичности про-

исходит в отсутствие мембран, разделяющих ядра по отдельным клеткам. Мембраны в итоге окружают ядра в ходе процесса, известного как **целлюляризация**, который происходит после 13-го деления ядер непосредственно перед гаструляцией (см. рис. 2.11). То, как происходит спецификация клеток перед целлюляризацией — кому суждено стать головой, грудью, брюшком или хвостом, — поистине потрясает! Распределены ли в разных участках бластодермы разные факторы детерминации, определяющие клеточную идентичность, как в случае автономной спецификации? Или же ядра в синцитии обретают свою идентичность в зависимости от соседних ядер, подобно тому, как это происходит при условной спецификации? На оба вопроса ответ утвердительный.

Положение определяют противонаправленные градиенты вдоль осей

В результате многочисленных исследований было выявлено, что, как и у других ооцитов, цитоплазма яйца *Drosophila* не однородна. Она содержит градиенты позиционной информации, диктующие выбор пути клеткам вдоль передне-задней оси яйца (Kimelman and Martin, 2012). Ядра в передней части синцитиальной бластодермы подвергаются влиянию цитоплазматических детерминантов, которые отсутствуют в задней части клетки, и наоборот. Статус клетки определяет именно взаимодействие ядер и различий в количестве детерминирующих факторов. После оплодотворения, по мере того как ядра проходят через синхронные волны деления (рис. 2.11Б), каждое ядро занимает положение с конкретными координатами вдоль передне-задней оси и подвергается действию уникальной комбинации факторов детерминации.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СПЕЦИФИКАЦИЯ ВСЕХ ЯДЕР В ОДНОЙ КОРЗИНЕ

Как ядра сохраняют свое положение в пределах синцитиальной бластодермы? Задействуют собственный аппарат цитоскелета: центросому и связанные с ней микротрубочки, актиновые филаменты и взаимодействующие с ними белки (Kanesaki et al., 2011; Koke et al., 2014). Так, когда ядра находятся между делениями (в интерфазе), от каждого из них расходятся *динамические* лучи микротрубочек, организованные их центросомой, которые устанавливают «орбиту» и оказывают влияние на «орбиты» других ядер (рис. 2.12). С каждым делением ядра структура из микротрубочек перестраивается для воздействия на орбиты соседних ядер, что обеспечивает их равномерное распределение в пространстве синцитиальной

¹ Синцитии встречаются у многих организмов, от грибов до человека. Примерами служат синцитии из половых клеток нематоды (соединенных цитоплазматическими мостиками), многоядерные волокна скелетных мышц и гигантские раковые клетки, образованные слиянием иммунных клеток.

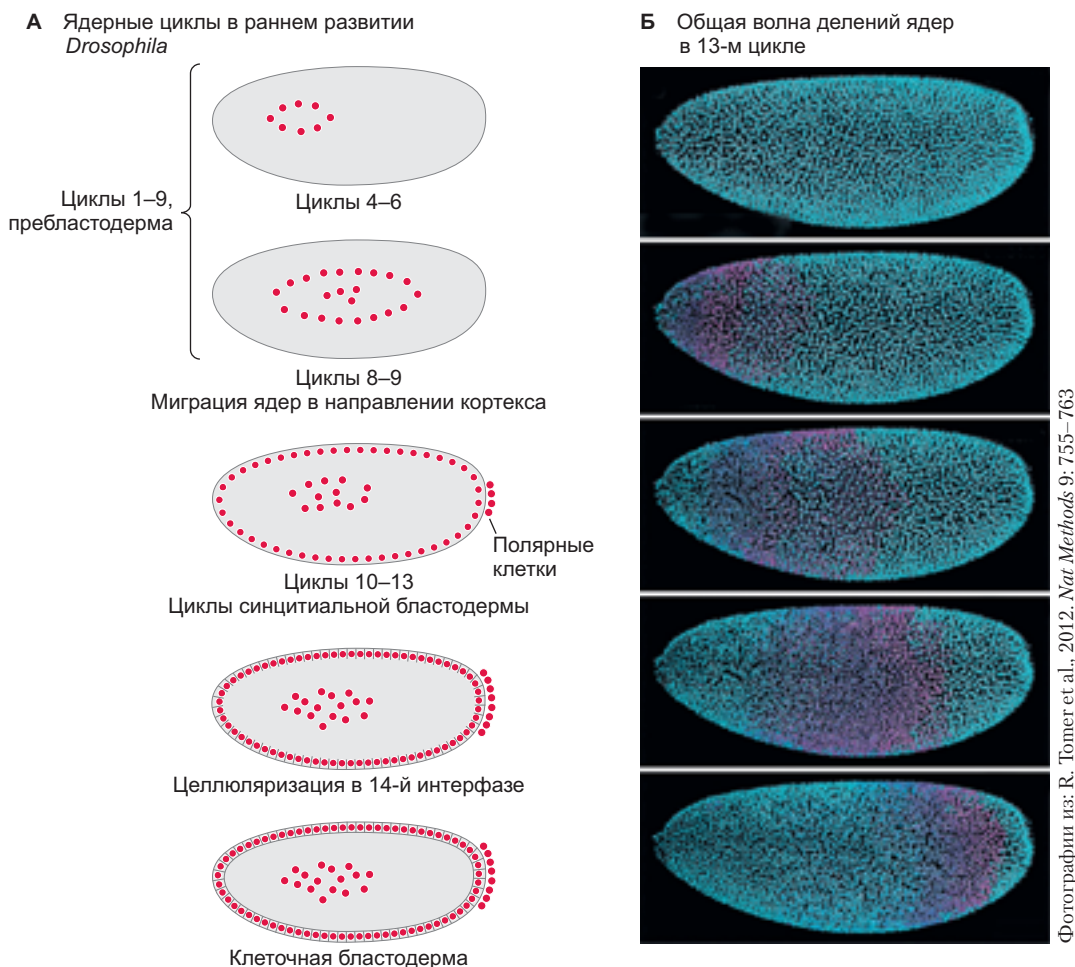


Рис. 2.11. Синцитиальная бластодерма *Drosophila melanogaster*. **А.** Схематичное изображение процесса целлюляризации у *Drosophila* (ядра показаны красным). **Б.** Отдельные кадры из замедленной съемки развития эмбриона *Drosophila*, на которых видны премитотические ядра (синие) и ядра, находящиеся в активной фазе митоза (фиолетовые). (Рис. А по данным: A. Mazumdar and M. Mazumdar, 2002. *BioEssays* 24: 1012–1022.)

бластодермы. Поддержание позиционных отношений между ядрами в раннем эмбрионе принципиально для успешной синцитиальной спецификации.

Сохранение стабильного положения ядер в ходе раннего развития позволяет каждому из них находиться под воздействием разного количества факторов детерминации, распределенных в общей цитоплазматической среде в виде градиентов. Ядро может интерпретировать собственное положение

(станет оно частью передней, средней или задней области тела), основываясь на концентрациях цитоплазматических детерминант, которые на него действуют. Таким образом, каждое ядро становится генетически запрограммированным в направлении определенного клеточного типа. Детерминанты являются **транскрипционными факторами** — ДНК-связывающими белками, которые регулируют транскрипцию генов.

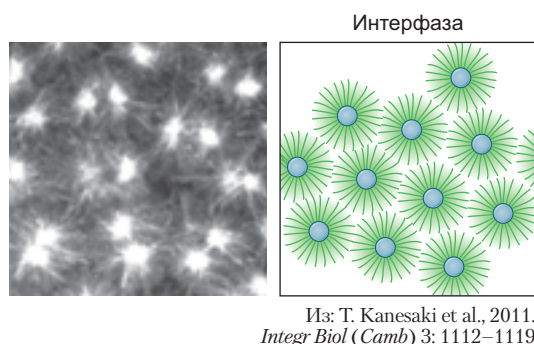
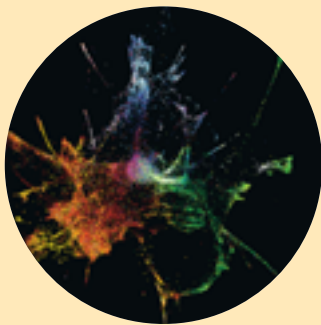


Рис. 2.12. Расположение ядер во время интерфазы 13-го ядерного цикла в синцитии *Drosophila melanogaster*. Ядра динамически организуются на протяжении синцития в раннем эмбрионе и удерживают свое положение, используя связанные с ними элементы цитоскелета. Слева: конструкт EB1–GFP выделяет микротрубочки, связанные с каждым ядром. Звездчатые структуры, определяющие орбиты ядер, несколько пересекаются с соседними. Справа: схема поддержания положения ядер в интерфазе для установления орбит. Такой вид распределения ядер и цитоплазматических структур был сгенерирован в результате компьютерного моделирования



С разрешения: Dan Wagner, Sean Megason и Allon Klein

О фотографии в начале главы

«Можно ли картировать развитие?» Такой вопрос был задан по поводу разноцветного временного ландшафта определения клеточных судеб, сделанного в первый день эмбриогенеза *Danio* Дэном Вагнером, Шоном Мегасоном и Аллоном Кляйном (Wagner et al., 2018). Философ Сёрен Кьеркегор однажды написал о сути, присущей отдельному человеку, но искажаемой шумом и направлением толпы. Сейчас в области биологии развития дифференцировку по большей части определяют в широких категориях клеточных типов, и исследователи гадают, сколько же «правды» мы, возможно, упускаем на уровне отдельных клеток. Хотя данное изображение — результат компьютерной реконструкции, на нем каждая клетка окрашена в разный оттенок на основании полного спектра экспрессированных в ней генов. Это полный спектр, радуга клеточных состояний, протянувшаяся от незрелых клеток до дифференцированных, а наиболее близкие родственники находятся рядом. Данный подход придвинул нас ближе к уточнению различий, лежащих в основе идентичности каждой отдельной клетки.

2

Коротко Определение идентичности

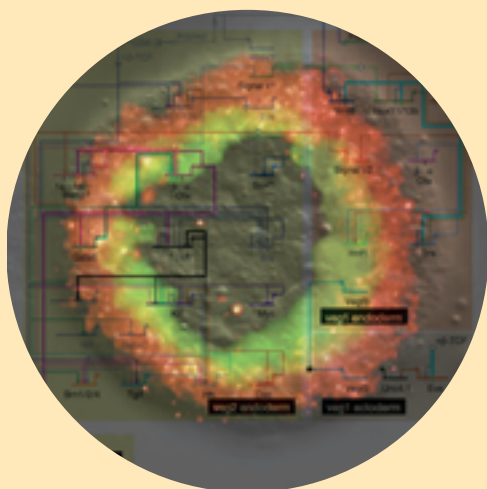
1. Клеточная дифференцировка — это процесс, в ходе которого клетка приобретает структурные и функциональные свойства, уникальные для данного клеточного типа.
2. На пути от недифференцированной клетки к закончившей деление дифференцированной клетке определенного типа клетка проходит процесс созревания с разной степенью приверженности своей траектории развития.
3. Вначале клетка специфицируется согласно данной траектории и дифференцируется в этом направлении даже в изоляции.
4. Клетка является коммитированной, обладающей детерминированной линией развития, если продолжает развитие и созревание в этом направлении, даже будучи пересаженной в новую среду.
5. Существует три вида спецификации клеток: автономная, условная и синцитиальная.
6. В случае автономной спецификации клетки раннего эмбриона содержат цитоплазматические детерминанты, коммитирующие их к определенному пути развития. Такие клетки даже в изоляции созревают только в соответствующие им детерминированные клеточные типы, наилучшим примером чего служат клетки эмбриона оболочника.
7. Конклин первым наблюдал желтый серп в эмбрионе оболочника и показал, что содержащие его клетки дают начало мышцам. Путь развития мышечных клеток у оболочников зависит от гена *macho*.
8. Условная спецификация — это приобретение определенной клеточной идентичности, основанное на положении клетки, или, точнее говоря, на ее взаимодействиях с другими клетками и молекулами, с которыми она контактирует. Пример условной спецификации — развитие нормальных личинок морского ежа из отдельных изолированных бластомеров.
9. У большинства видов есть клетки, развивающиеся посредством автономной спецификации, и клетки, развивающиеся посредством условной спецификации. К примеру, для эмбрионов многих растений характерно асимметричное первое деление, движимое автономной спецификацией, и последующее развитие растения путем условной спецификации.
10. Синцитиальная спецификация имеет место, когда путь развития клеток определяется в ядерном синцитии, как в случае бластодермы *Drosophila*.
11. Цитоскелетные перестройки поддерживают расположение ядер в синцитии, что делает возможным их спецификацию противонаправленными градиентами морфогенов.

Дифференциальная экспрессия генов:

механизмы дифференцировки клеток

3

Что лежит в основе дифференцировки клеток?



По данным: I. S. Peter and E. H. Davidson, 2011.
Nature 474: 635–639

Из одной клетки образуется множество клеток, относящихся к различным типам. В этом состоит явление эмбрионального развития, которые легко можно принять за чудо. Как возможно получить такое разнообразие клеточных типов многоклеточного организма из одного оплодотворенного яйца? Цитологические исследования, проведенные в начале XX в., позволили установить, что хромосомы каждой клетки организма являются митотическими потомками хромосом, объединенных в результате оплодотворения (Wilson, 1896; Boveri, 1904). Другими словами, ядро любой соматической клетки содержит такие же хромосомы, а следовательно, тот же самый набор генов, что и ядра всех других соматических клеток. Этот фундаментальный принцип, известный как **геномная эквивалентность**, породил важную концептуальную дилемму. Если каждая клетка тела содержит гены, например, гемоглобина и инсулина, почему белок гемоглобин производят только красные клетки крови, а инсулин — только определенные клетки поджелудочной железы? На основании эмбриологических свидетельств в пользу геномной эквивалентности (а также бактериальных моделей генной регуляции) в 1960-х гг. ученые пришли к единому мнению, что ответ лежит в *дифференциальной экспрессии генов*.

Определение дифференциальной экспрессии генов

В ходе дифференциальной экспрессии генов клетки приобретают различия вследствие уникальной комбинации генов, которые в них активны, или экспрессируются. Экспрессируя различные гены, клетки могут создавать разные белки, ведущие к дифферен-

цировке в определенные клеточные типы. Вот три постулата дифференциальной экспрессии генов:

1. Ядро каждой соматической клетки организма содержит полный геном, сформированный в оплодотворенном яйце. ДНК всех дифференцированных клеток идентичны.
2. Неиспользуемые гены в дифференцированных клетках не разрушаются и не мутируют; они сохраняют потенциальную возможность экспрессироваться.
3. В каждой клетке экспрессируется лишь малый процент генома, и часть РНК, синтезируемой в ней, специфична для данного клеточного типа.

К концу 1980 г. было установлено, что экспрессия генов может регулироваться на четырех уровнях:

1. *Уровень 1: Дифференциальная транскрипция генов* регулирует, какие из ядерных генов транскрибируются в пре-мРНК.
2. *Уровень 2: Селективный процессинг пре-мРНК* регулирует, какая часть РНК-транскриптов сможет войти в цитоплазму и стать матричными РНК.
3. *Уровень 3: Селективная трансляция матричных РНК* регулирует, какие из мРНК в цитоплазме будут транслированы в белки.
4. *Уровень 4: Дифференциальная посттрансляционная модификация белков* регулирует, каким из белков будет позволено сохраниться и/или функционировать в клетке.

Некоторые гены (например, кодирующие глобиновые белки, субъединицы гемоглобина) подвержены регуляции на всех этих уровнях. Именно благодаря такому множеству способов регуляции экспрессии генов на основе относительно небольшого их числа возможно получение чрезвычайного разнообразия доступных паттернов экспрессии белков, которое дает огромное число различных типов клеток в организмах животных и растений.

Короткий курс по центральной догме

Чтобы лучше разобраться в механизмах дифференциальной экспрессии гена, прежде всего необходимо понять принципы, лежащие в основе **центральной догмы** биологии. Термин «центральная догма» включает в себя последовательность событий, обеспечивающих использование и перенос информации для построения клеточных белков (**рис. 3.1**). В центре внимания теории находится последовательность дезоксирибонуклеотидов в двухцепочечной ДНК, которая представляет собой информационный код, или программу точной последовательности аминокислот, необходимую для построения конкретного белка. Однако белки не возникают непосредственно на ДНК; последова-

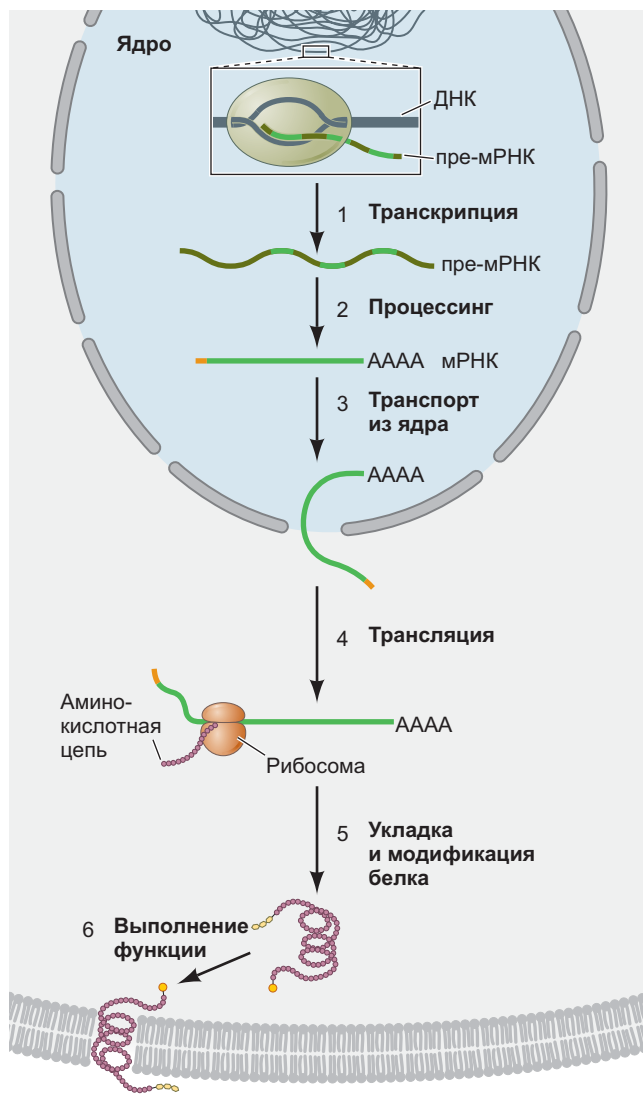


Рис. 3.1. Центральная догма биологии. Упрощенная схема ключевых событий в экспрессии белок-кодирующего гена. (1) Транскрипция. В ядре показан участок геномной ДНК, доступный для РНК-полимеразы II, которая транскрибирует точную комплементарную копию гена в форме одноцепочечной молекулы пре-мРНК. В этом случае говорят, что данный ген экспрессируется. (2) Процессинг. Транскрипт пре-мРНК проходит процессинг с образованием завершенной цепи мРНК, которая транспортируется из ядра (3). (4) Трансляция. мРНК образует комплекс с рибосомой, и закодированная в ней информация транслируется в упорядоченный полимер из аминокислот. (5) Укладка и модификация белка. Полипептид принимает свою вторичную и третичную структуры посредством укладки белка и, возможно, модификаций (таких как показанное здесь добавление углеводного остатка). (6) Про такой белок говорят, что он экспрессируется; теперь он может выполнять свою специфическую функцию (например, трансмембранного рецептора)

тельность оснований ДНК сначала копируется, или *транскрибируется*, на одноцепочечные полимеры похожих молекул, называемых гетерогенными ядерными РНК (гЯРНК) или чаще пре-мРНК. Процесс копирования ДНК на РНК называют **транскрипцией**, а произведенную с данного гена РНК — *транскриптом*. Хотя транскрибированная пре-мРНК содержит последовательности, кодирующие белок, она может нести и не кодирующую белок информацию (которую называют просто некодирующей). Цепь пре-мРНК проходит процессинг для вырезания некодирующих доменов и защиты концов цепи, в результате чего образуется молекула **матричной РНК (мРНК)**. мРНК транспортируется из ядра в цитоплазму, где может взаимодействовать с рибосомой и служить *матрицей* для синтеза определенного белка. мРНК представляет комплементарную последовательность ДНК одновременно по трем основаниям. Каждый триплет, или кодон, соответствует определенной аминокислоте, которая будет ковалентно связана с соседней аминокислотой, обозначаемой следующим кодоном в последовательности. Таким образом, **трансляция** ведет к синтезу полипептидной цепи, которая далее претерпевает укладку, или фолдинг, белка и потенциальные модификации путем присоединения разнообразных функциональных остатков, таких как углеводороды, фосфаты или группы холестерина. Сформированный белок теперь готов выполнять свою специфичную функцию, необходимую для поддержания структурных или функциональных свойств клетки. Таким образом, клетки, экспрессирующие разные белки, будут обладать структурными и функциональными свойствами, определяющими их принадлежность к различным типам.

Доказательства геномной эквивалентности

До середины XX в. о существовании геномной эквивалентности скорее предполагали (поскольку каждая клетка является потомком оплодотворенного яйца через серию митозов), чем она была доказанным фактом. Одной из первых задач генетики развития было определить, действительно ли каждая клетка организма содержит один и тот же **геном** (набор генов), что и любая другая, т. е. их *геномы эквивалентны*.

Ранний анализ хромосом плодовой мушки (*Drosophila*) принес первые данные о том, что клетки тела содержат один и тот же геном, но, вероятно, используют его по-разному. В некоторых личиночных тканях *Drosophila* ДНК проходит несколько циклов репликации без разделения, в результате чего структура хромосом становится доступной для наблюдения. Такие **политенные** (в пер. с греч. — много нитей) **хромосомы** в клетках не различаются по структуре; однако разные области хромосом «вздувались» во всех типах клеток в разное время, что указывало на активное производство РНК в этих областях (**рис. 3.2А**; Veermann, 1952). Данные наблюдения были подтверждены с помощью гибридизации нуклеиновых кислот *in situ* — метода, который делает возможной визуализацию пространственного и временного паттерна экспрессии конкретного гена (мРНК) (см. рис. 3.27). К примеру, клетки эмбриона *Drosophila*, в которых присутствует мРНК гена *odd-skipped*, организованы в сегментированный паттерн, который к тому же меняется со временем (рис. 3.2Б). Подобным образом гомолог *odd-skipped* у мышей, называемый

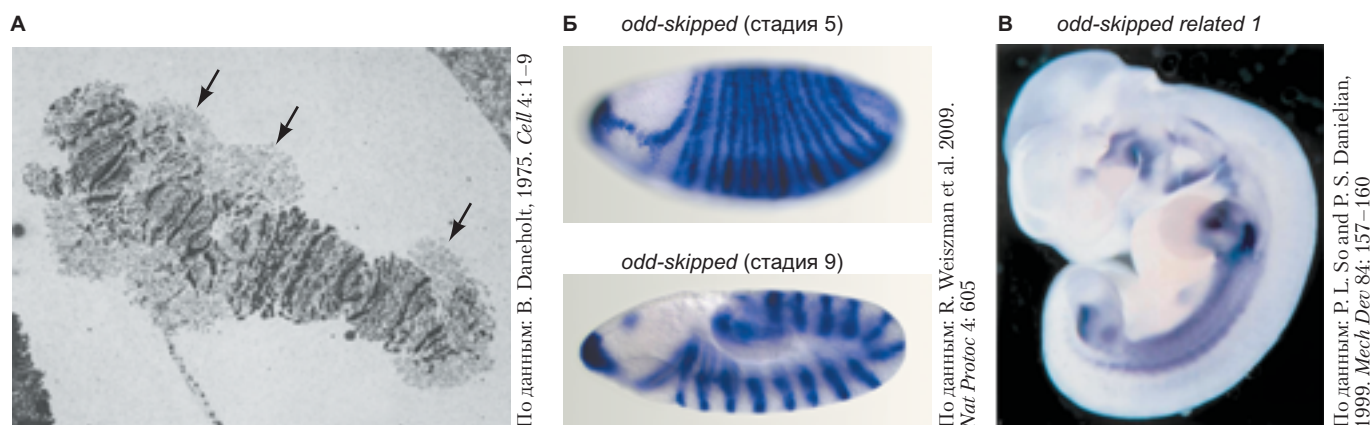


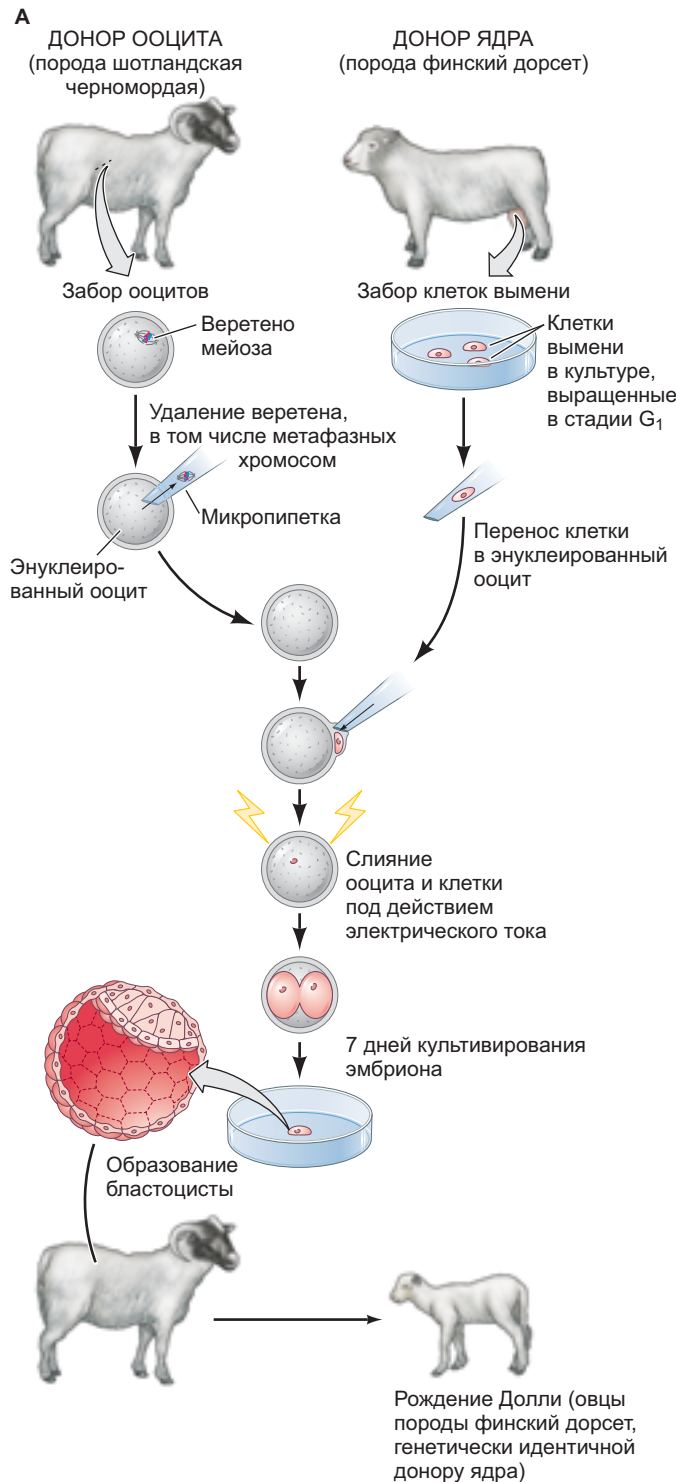
Рис. 3.2. Экспрессия генов. **А.** Полученная с помощью трансмиссионно-электронного микроскопа микрография политенной хромосомы из слюнных желез личинки звонца (*Chironomus tentans*), на которой видны три гигантских пуха, указывающие на активную транскрипцию в этих областях (*стрелки*). **Б.** Экспрессия мРНК гена *odd-skipped* в эмбрионах *Drosophila* на стадиях 5 и 9 (показана *синим* цветом с использованием гибридизации *in situ* с антисмысловой DIG-меченой РНК-пробой; см. «Основные инструменты генетики развития» и рис. 3.27). **В.** Экспрессия мРНК гена *odd-skipped related 1* в эмбрионе мыши на стадии 11,5 дней после зачатия (*синий*)

odd-skipped related 1, дифференциально экспрессируется в клетках сегментированных жаберных дуг, почек конечности и сердца (рис. 3.2В).

Однако является ли ДНК в клетках организма, экспрессирующих разные гены, действительно эквивалентной? Решающей проверкой того, претерпело ли ядро дифференцированной клетки необратимые функциональные ограничения, является попытка создания другого типа дифференцирован-

ных клеток из этого ядра. Если каждая клетка содержит ДНК, идентичную содержащейся в зиготе, тогда каждое ядро тоже должно быть способно направлять все развитие организма при пересадке в активированный энуклеированный ооцит.

Такие данные появились в 1952 г., когда Бриггс и Кинг продемонстрировали пересадку ядра из бластулы лягушки в энуклеированный ооцит, в результате которой происходило развитие полноценного эмбриона (Briggs and King, 1952). Десятилетием позже Джон Гёрдон провел решающий эксперимент, за который был удостоен Нобелевской премии в 2012 г.: он показал, что ядро дифференцированной клетки, взятой из кишечника головастика, может направлять полноценное развитие от энуклеированного ооцита до *клонированной* взрослой лягушки (Gurdon et al., 1958). Геномная эквивалентность у млекопитающих была подтверждена в 1997 г. Яном Вилмутом и его коллегами, когда они показали, что из соматиче-



Б



Фотография: Roddy Field © Рослинский институт

Рис. 3.3. Клонирование млекопитающих с использованием ядер взрослых соматических клеток. **А.** Процедура, использованная для клонирования овцы. **Б.** Долли, взрослая овца слева, была получена путем слияния ядра клетки молочной железы с энуклеированным ооцитом, который после этого был имплантирован суррогатной матери (другой породы овец), родившей Долли. Сама она впоследствии размножалась обычным образом и родила ягненка (Бонни, справа). (Рис. А по данным: I. Wilmut et al., 2000. *The Second Creation: Dolly and the Age of Biological Control*. Harvard University Press: Cambridge, MA.)

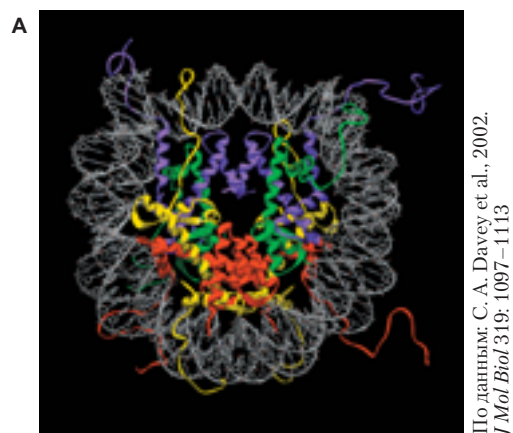
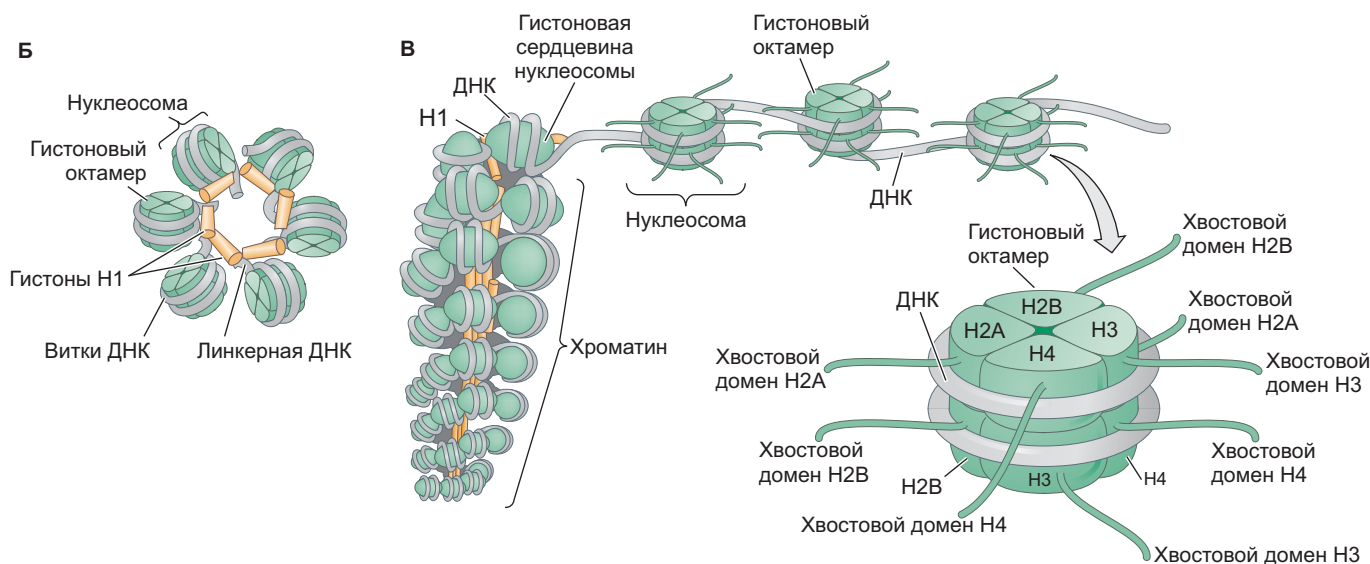


Рис. 3.4. Нуклеосомы и структура хроматина. **А.** Модель структуры нуклеосомы на основе рентгеновской кристаллографии с разрешением 1,9 Å. Гистоны H2A и H2B отмечены соответственно желтым и красным; H3 отмечен фиолетовым; H4 — зеленым. Спираль ДНК (серая) оборачивается вокруг белковой сердцевинки. «Хвосты» гистонов, отстоящие от сердцевинки, служат сайтами процессов ацетилирования и метилирования, способных соответственно нарушить или стабилизировать образование нуклеосомных сборок. **Б.** Гистон H1 может стягивать нуклеосомы вместе в компактные образования. Около 147 пар оснований ДНК оборачивают каждый гистоновый октамер, и примерно 60–80 пар оснований ДНК связывают нуклеосомы вместе. **В.** Модель сборки нуклеосом в очень компактную соленоидную структуру хроматина. Хвосты гистонов, выступающие за нуклеосомы, делают возможным присоединение химических групп



ской клетки взрослого млекопитающего возможно развитие целой овцы; эту овцу они назвали Долли (рис. 3.3; Wilmut et al., 1997). Возможность клонирования взрослых млекопитающих была подтверждена для морских свинок, кроликов, крыс, мышей, собак, кошек, лошадей и коров. В 2003 г. клонированный мул стал первым стерильным животным, воспроизведенным таким образом (Woods et al., 2003). Итак, ядра соматических клеток у взрослых позвоночных животных, по всей видимости, содержат все гены, необходимые для формирования взрослого организма. В соматических клетках не утраиваются и не мутируют никакие гены, необходимые для развития; *ДНК их ядер эквивалентна*¹.

¹ Хотя у клонированных животных правильно развивались все органы, многие из клонов по мере созревания начали страдать тяжелыми заболеваниями (Humphreys et al., 2001; Jaenisch and Wilmut, 2001; Kolata, 2001). Как мы вскоре увидим, проблема может заключаться в различиях характера метилирования хроматина в зиготе и дифференцированной клетке.

Анатомия гена

Как один и тот же геном дает начало различным типам клеток? Чтобы подойти к ответу на этот вопрос, мы должны понять анатомию генов.

Состав хроматина

Фундаментальное различие между большинством эукариотических генов и прокариотическими генами состоит в том, что первые содержатся внутри комплекса ДНК и белков, называемого **хроматином**. Белковый компонент составляет приблизительно половину массы хроматина и состоит преимущественно из **гистонов**. Базовой единицей структуры хроматина является **нуклеосома** (рис. 3.4А, Б). Она состоит из октамера гистоновых белков (по две молекулы H2A, H2B, H3 и H4), обернутых двумя петлями ДНК длиной приблизительно 147 пар оснований (Kornberg and Thomas, 1974), причем ДНК соединяется с гистонами более чем дюжиной

контактов (Luger et al., 1997; Bartke et al., 2010). Благодаря нуклеосом достигается впечатляющая компактизация более чем 6 футов ДНК (182 см) в ядре клетки человека размером примерно 6 мкм (Schones and Zhao, 2008).

В то время как классические генетики сравнивали гены с «бусинами на нитке», молекулярные генетики сравнивают их с «ниткой на бусинах», где бусинами являются нуклеосомы. Большую часть времени нуклеосомы сплетены в компактные структуры, известные как **соленоиды**, стабилизированные гистонами H1 (рис. 3.4В). H1-зависимая конформация нуклеосом подавляет транскрипцию генов в соматических клетках за счет упаковки соседних нуклеосом в плотные структуры, препятствующие доступу транскрипционных факторов и РНК-полимераз к генам (Thoma et al., 1979; Schlissel and Brown, 1984). Плотно упакованные участки хроматина называют **гетерохроматином**, а рыхло упакованные — **эухроматином**. Один из способов достижения дифференциальной экспрессии генов сводится к регуляции плотности упаковки данного участка хроматина, т. е. принципиальной доступности гена для транскрипции.

Экзоны и интроны

Кроме упаковки в хроматине, еще одна фундаментальная особенность, отличающая эукариотические гены от прокариотических, в том, что первые не коллинеарны своим пептидным продуктам. Единая цепочка нуклеотидов эукариотической мРНК, транслируемая в белок, происходит из несмежных участков на хромосоме. **Экзоны** — участки ДНК, кодирующие части белка¹; между экзонами, однако, находятся промежуточные последовательности, называемые **интронами**, которые не имеют никакого отношения к аминокислотной последовательности белка.

Основные части гена эукариот

Чтобы было легче разобраться в структурных компонентах типичного эукариотического гена, мы разберем анатомию гена β-глобина человека (рис. 3.5). Этот ген, кодирующий часть белка красных кровяных клеток гемоглобина, состоит из следующих элементов:

- **Промотор** — участок связывания фермента **РНК-полимераза II**, запускающего транскрипцию. Промотор человеческого гена β-глобина содержит три отдельные единицы и лежит в нескольких парах оснований «вверх по течению»² от сайта инициации транскрипции. Некоторые промоторы включают последовательность ДНК ТАТА (называемую **ТАТА-боксом**), которая связывает белок ТВР (TATA-binding protein), способствующий закреплению РНК-полимеразы II на промоторе.

- **Сайт инициации транскрипции**, часто называемый **кэп-последовательностью**, поскольку именно здесь кодируется добавление модифицированного нуклеотида «кэпа» на 5' — конец РНК вскоре после транскрипции. С кэп-последовательности начинается первый экзон.

- **5'-Нетранслируемая область (5'-НТО, 5'-UTR)**, также известная как **лидерная последовательность**. Это последовательность оснований, разделяющая точки инициации транскрипции и трансляции. 5'-НТО может определять скорость инициации трансляции.

- **Сайт инициации трансляции (ATG)**. Последовательность ATG, в РНК превращающаяся в AUG, присуща каждому гену. У разных генов может различаться расстояние, на котором этот кодон расположен относительно сайта инициации транскрипции.

- Белок-кодирующие последовательности **экзонов** перемежаются некодирующими последовательностями **интронов**; число экзонов и интронов может меняться в зависимости от гена.

- **Кодон терминирования трансляции (ТАА)**. В мРНК превращается в UAA. Когда рибосома сталкивается с этим кодоном, она диссоциирует, высвобождая белок. В других генах сигналом к терминированию трансляции могут служить также кодоны **TAG** или **TGA**.

- **3'-Нетранслируемая область (3'-НТО, 3'-UTR)**, будучи транскрибируемой, не транслируется в белок. Она включает последовательность ААТААА, необходимую для **полиаденилирования** — добавления «хвоста» из 200–300 повторяющихся остатков аденозинмонофосфата к РНК-транскрипту. Поли-А-хвост, во-первых, придает мРНК стабильность; во-вторых, позволяет мРНК покинуть ядро и, в-третьих, позволяет мРНК быть транслированной в белок.

- **Последовательность терминирования транскрипции**. За пределами сайта ААТААА транскрипция продолжается приблизительно на протяжении 1000 нуклеотидов, после чего прекращается.

Продукт транскрипции и его процессинг

Исходный продукт транскрипции называют гетерогенной ядерной РНК (гЯРНК), или пре-мРНК. Пре-мРНК содержит кэп-последовательность, 5'-НТО, экзоны, интроны, 3'-НТО и поли-А-хвост. Оба конца таких транскриптов подвергаются модификации,

¹ Термин «экзон» относится к нуклеотидной последовательности, РНК которой покидает ядро (от англ. exit — выходить). Он принял функциональное определение белок-кодирующей нуклеотидной последовательности.

² Принято указывать направления спереди, сзади, с 5'-стороны и с 3'-стороны относительно РНК. Таким образом, промотор находится спереди от области транскрибируемого гена, вблизи его 5'-конца.

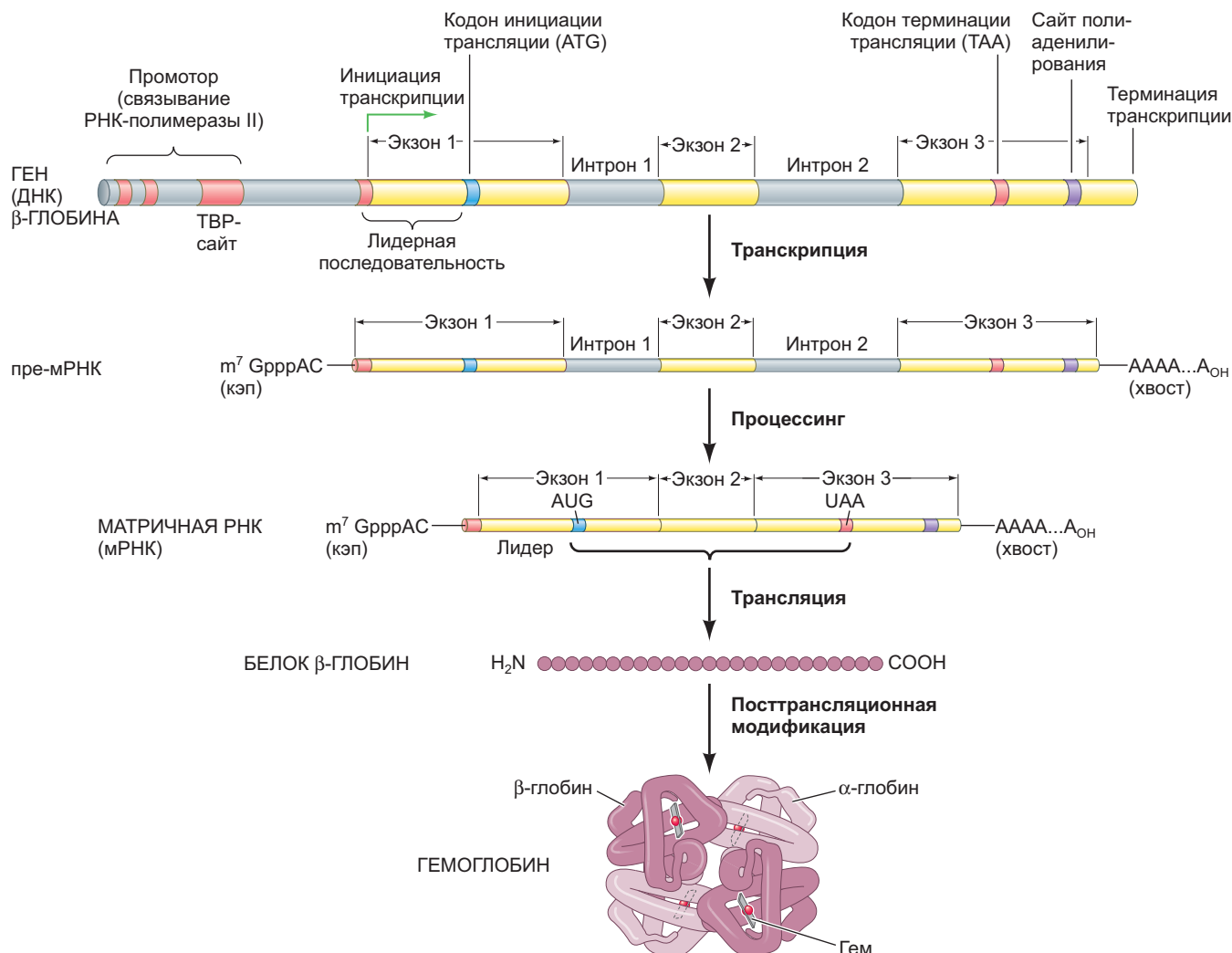


Рис. 3.5. Этапы образования β-глобина и гемоглобина. Транскрипция гена β-глобина создает пре-мРНК, содержащую экзоны и интроны, а также кэп, поли-А-хвост, 3'- и 5'-некодирующие области. В ходе процессинга пре-мРНК удаляются интроны и образуется матричная РНК. Трансляция на рибосоме использует РНК для синтеза белка. Белок β-глобин не активен до модификации и образования комплекса с α-глобином и гемом для формирования активного гемоглобина (внизу)

до того как РНК покинет ядро. На 5'-конце РНК содержится кэп, состоящий из модифицированного гуанозина, по полярности противонаправленного самой РНК, т. е. на 5'-конце пре-мРНК нет свободной фосфатной группы. 5'-Кэпирование необходимо для связывания мРНК с рибосомой и последующей трансляции (Shatkin, 1976). И 5'-, и 3'-модификации защищают мРНК от ферментов экзонуклеаз, которые в противном случае расщепили бы ее с концов полинуклеотидной цепи (Sheiness and Darnell, 1973; Gedamu and Dixon, 1978).

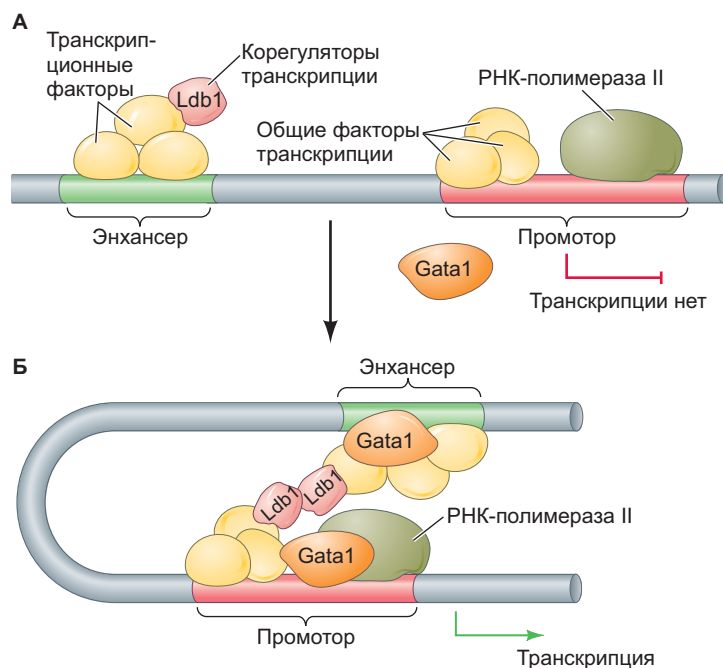
До того как пре-мРНК покинет ядро, из нее удаляются интроны, а оставшиеся экзоны сшиваются вместе. Таким образом, кодирующие области мРНК, т. е. экзоны, совмещаются с образованием единого непрерывного транскрипта, и этот транскрипт транслируется в белок. Далее белок может быть модифи-

цирован для обеспечения функциональности (см. рис. 3.5).

Некодирующие регуляторные элементы: включение, выключение, регулировка активности гена

Регуляторные последовательности могут располагаться с любой стороны гена (и даже внутри его). Мы уже упоминали одну из таких некодирующих последовательностей — промотор; дополнительные последовательности включают *энхансеры* и *сайленсеры*. Эти регуляторные элементы необходимы для контроля того, где, когда и насколько активно будет транскрибироваться конкретный ген. Когда они локализируются

Рис. 3.6. Между энхансером и промотором может выстроиться мост из транскрипционных факторов. Определенные транскрипционные факторы, называемые общими факторами транскрипции, связываются с ДНК в области промотора (там, где РНК-полимераза II запускает транскрипцию), в то время как другие транскрипционные факторы связываются с энхансером (который регулирует, когда и где будет запущена транскрипция). Другие регуляторы транскрипции не связываются с ДНК, однако сцепляются с транскрипционными факторами, сидящими на последовательностях промотора и энхансера. За счет этого формируется петля хроматина, соединяющая энхансер и промотор. В этом примере показан ген β -глобина мыши. **А.** Транскрипционные факторы собрались в области энхансера, однако промотор не используется до тех пор, пока на него не сядет транскрипционный фактор Gata1. **Б.** Gata1 привлекает некоторые другие факторы, включая Ldb1, которые соединяют между собой факторы, связанные с энхансером, и факторы, связанные с промотором. (По данным: W. Deng et al., 2012. *Cell* 149: 1233–1244.)



на той же хромосоме, что и сам ген (а обычно так и бывает), говорят, что это **цис-регуляторные элементы**¹.

Промоторы, как мы уже упоминали, — это сайты связывания РНК-полимеразы II и ДНК для инициации транскрипции. Они обычно расположены непосредственно перед местом, с которого РНК-полимераза II начинает транскрипцию. Большинство промоторов содержит участок протяженностью около 1000 пар оснований, богатый последовательностями CG, которые часто называют CpG (нуклеотиды C и G, соединенные нормальной фосфатной связью). Эти области называют **СрG-островками** (Down and Hubbard, 2002; Deaton and Bird, 2011). Считается, что причина инициации транскрипции около СрG-островков связана с белками под названием **общие факторы транскрипции**. Общие факторы транскрипции связываются с ДНК в области промотора, образуя «седло», привлекающее РНК-полимеразу II и располагающее ее в правильном положении для запуска транскрипции (**рис. 3.6**; Kostrewa et al., 2009).

Однако РНК-полимераза II не связывается одновременно со всеми промоторами, которые есть в геноме. Ее привлекают и стабилизируют на промоторах последовательности ДНК, называемые **энхансерами**: они указывают, где и когда может быть задействован промотор и сколько требуется произвести продукта гена (см. рис. 3.6). Другими словами, энхансеры кон-

тролируют эффективность и скорость транскрипции с конкретного промотора (Ong and Corces, 2011). И наоборот, последовательности ДНК, называемые **сайленсерами** (или **репрессорами**), могут предотвращать использование промотора и ингибировать транскрипцию гена.

По определению, **транскрипционные факторы** — это белки, связывающиеся с ДНК путем точного распознавания последовательностей определенных промоторов, энхансеров или сайленсеров. Транскрипционные факторы действуют двумя способами, которые не являются взаимоисключающими:

1. Транскрипционные факторы привлекают белки, модифицирующие нукleosомы, в соответствующий участок генома, делая хроматин в нем более доступным для проведения транскрипции РНК-полимеразой II.
2. Транскрипционные факторы привлекают **корегуляторы транскрипции** для образования мостиков, формирующих петлю хроматина таким образом, что связанные с энхансером транскрипционные факторы оказываются вблизи промотора (см. рис. 3.6). Корегуляторы транскрипции могут работать и как коактиваторы, и как корепрессоры транскрипции. В ходе активации генов β -глобина у млекопитающих промотор и энхансер соединяются мостиком из белков коактиваторов транскрипции, связывающих транскрипционные факторы на последовательностях как энхансера, так и промотора. Такие белковые комплексы образуют структуры, привлекающие ферменты модификации нукleosом и общие факторы транскрипции, которые совместно стабилизируют РНК-полимеразу II и способствуют транскрипции (см. рис. 3.6; Deng et al., 2012; Noordermeer and Duboule, 2013; Gurdon, 2016).

¹ *Цис-* и *транс-*регуляторные элементы были названы так по аналогии с генетикой *E. coli* и органической химией. Таким образом, *цис*-элементы — это те регуляторные элементы, что расположены на той же хромосоме (*cis* — на той же стороне), в то время как *транс*-элементы могут находиться на других хромосомах (*trans* — на другой стороне).



Загадки развития

Каковы последствия модулярности энхансеров для развивающейся особи? А для вида? Как могла бы повлиять на развитие мутация в энхансере? К примеру, что случится с эмбрионом в случае мутации в энхансерной области гена *Pax6*? Может ли такая мутация иметь эволюционное значение? Подсказка: имеет, причем важнейшее.

ЭНХАНСЕРЫ

Энхансеры — это регуляторные элементы, которые могут активировать и усиливать (англ. *enhance*) процесс транскрипции путем связывания транскрипционных факторов, образующих мостик между энхансером и промотором (см. рис. 3.6). Как правило, энхансеры активируют только промоторы на одной с ними хромосоме, в связи с чем их иногда называют *цис*-регуляторными элементами. Однако за счет укладки ДНК энхансеры могут регулировать гены на огромном расстоянии (в некоторых случаях до 1 млн оснований) от промотора (Visel et al., 2009). Более того, энхансеры не обязательно находятся в 5'-положении относительно гена (перед ним); они могут располагаться в 3'-положении или даже локализовываться внутри интронов (Maniatis et al., 1987). Важный энхансер гена, задействованный в развитии мизинца на каждой из наших конечностей, находится в интроне *другого* гена, на расстоянии примерно в 1 млн нуклеотидных пар от своего промотора (Lettice et al., 2008). В каждой клетке энхансер присоединяет определенные транскрипционные факторы, связывает регуляторы нуклеосом и медиаторный комплекс и взаимодействует с промотором для транскрипции гена в клетках данного типа (рис. 3.7А).

АКТИВАЦИЯ ЭНХАНСЕРОВ

Несмотря на то что энхансерные последовательности ДНК одинаковы во всех типах клеток, их активация может различаться. Различие обусловлено наборами белков транскрипционных факторов, которые взаимодействуют с энхансерами. Связавшись с энхансерами, транскрипционные факторы могут усиливать или подавлять активность РНК-полимеразы II в отношении инициации транскрипции. С энхансером может связаться несколько транскрипционных факторов, и именно специфическая комбинация присутствующих транскрипционных факторов позволяет гену проявлять активность в определенных типах клеток. Один и тот же транскрипционный фактор в комбинациях с другими факторами активирует различные промоторы в различных клетках. Более

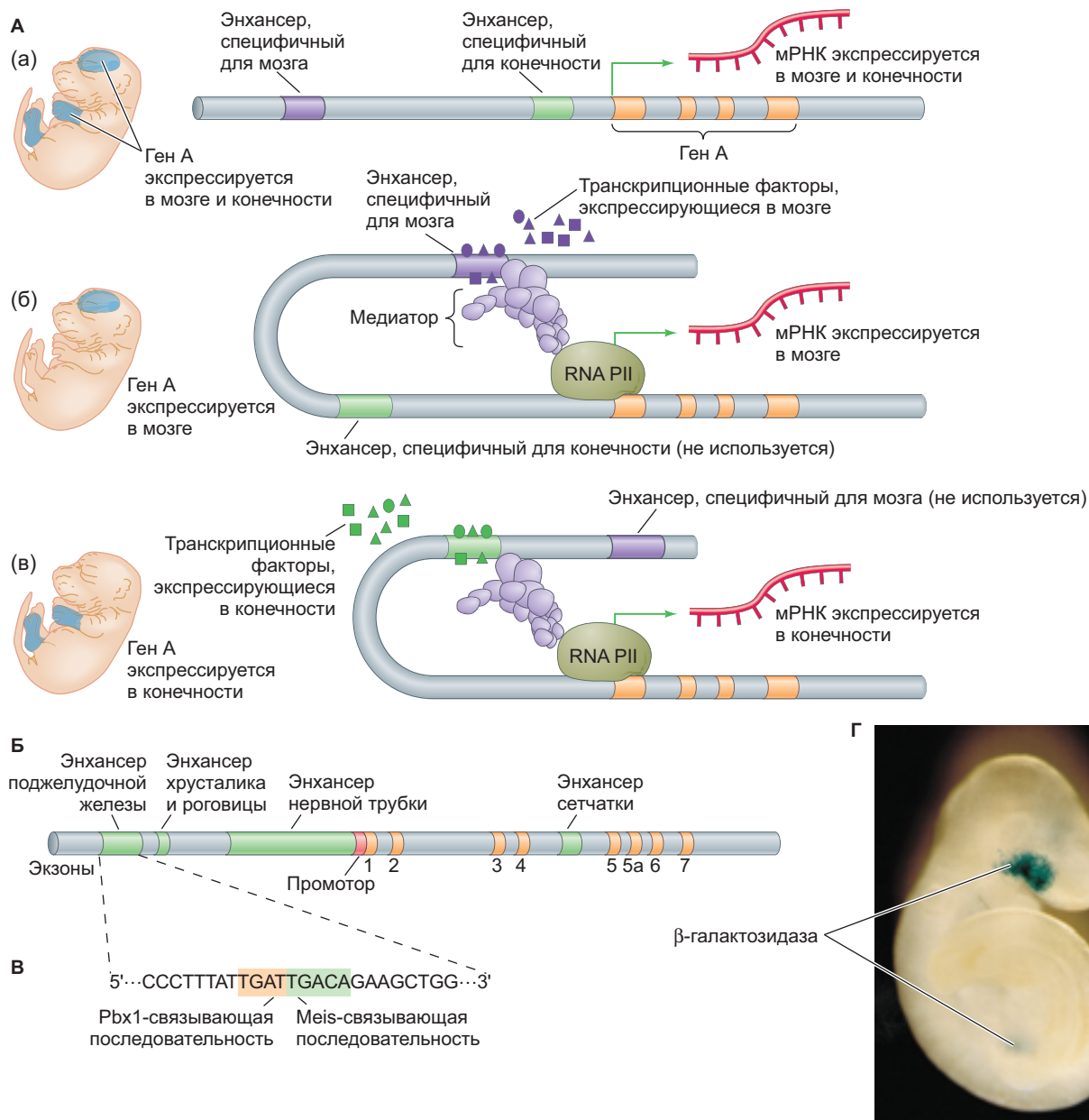
того, у одного гена может быть несколько энхансеров, каждый из которых связывает транскрипционные факторы, позволяющие ему экспрессироваться в разных типах клеток.

Ген *Pax6* мыши (экспрессирующийся в хрусталике, роговице и сетчатке глаза, в нервной трубке, в поджелудочной железе) имеет несколько энхансеров (рис. 3.7Б–Г; Kammandel et al., 1998; Williams et al., 1998). Расположенная на самом большом расстоянии перед промотором энхансерная последовательность содержит участок, необходимый для экспрессии *Pax6* в поджелудочной железе, в то время как второй энхансер активирует экспрессию *Pax6* в поверхностной эктодерме (хрусталик, роговица, конъюнктура). Третий энхансер располагается внутри лидерной последовательности; он содержит последовательность, запускающую экспрессию *Pax6* в нервной трубке. Четвертый энхансер, расположенный в интроне вскоре после точки инициации трансляции, определяет экспрессию *Pax6* в сетчатке. Ген *Pax6* иллюстрирует принцип модулярности энхансеров, согласно которому наличие у гена множества отдельных энхансеров позволяет белку экспрессироваться в нескольких тканях, но не экспрессироваться во всех остальных.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ПОИСК ЭНХАНСЕРОВ

Идентификация энхансеров оказалась трудной задачей, однако исследователи придумали новый метод. Они создали конструкторы из возможных энхансеров в сочетании с **репортерным геном** (геном, который кодирует видимый маркер), затем внебрили их в эмбрионы и отслеживали пространственный и временной характер экспрессии видимого белкового продукта репортерного гена (такого как ген зеленого флуоресцентного белка — *green fluorescent protein*, или *GFP*; рис. 3.8А). Если последовательность содержит энхансер, репортерный ген должен проявлять активность в определенные моменты и в определенных местах в зависимости от специфичности энхансера. В качестве другого репортерного гена часто используют ген *E. coli*, кодирующий β-галактозидазу (ген *lacZ*). Он был объединен: 1) с промотором, способным активироваться в любой клетке; 2) с энхансером, направляющим экспрессию определенного гена (*Myf5*) только в мышцах мыши. Когда такой конструктор вводят в только что оплодотворенный ооцит мыши, он внедряется в ее геном. Когда у эмбриона развиваются мышцы, экспрессия белка β-галактозидазы проявляет паттерн экспрессии, соответствующий таковому у специфичного для мышц гена *Myf5* (рис. 3.8Б).



Из: S. C. Williams et al., 1998. *Mech Dev* 73: 225–229, любезно предоставлено R. A. Lang

Рис. 3.7. Модульность энхансерных областей. **А.** Модель регуляции генов с помощью энхансеров. (а) На верхней схеме показаны интроны, промотор и энхансеры гипотетического гена А, но не показано, как два энхансера задействованы в регуляции экспрессии этого гена (см. б и в). *In situ*-гибридизация (слева) показывает, что ген А экспрессируется в клетках конечности и мозга. (б) В развивающихся клетках мозга специфичные для него факторы транскрипции связываются с соответствующим энхансером, что вызывает присоединение к нему медиатора, стабилизацию РНК-полимеразы II (RNA PII) на промоторе и модификацию нуклеосом в промоторной области. Ген транскрибируется только в клетках мозга; энхансер конечности не работает. (в) Аналогичный процесс обеспечивает экспрессию этого гена в клетках конечностей. Ген не транскрибируется в типах клеток, в которых транскрипционные факторы не связываются с его энхансерами. **Б.** Белок Рах6 необходим для развития нескольких весьма сильно различающихся тканей. Энхансеры дифференциально руководят экспрессией гена Рах6 (оранжевые экзоны 1–7) в поджелудочной железе, хрусталике и роговице глаза, сетчатке и нервной трубке. **В.** Часть последовательности ДНК энхансерного элемента, специфичного для поджелудочной железы. Эта последовательность содержит сайты связывания транскрипционных факторов Pbx1 и Meis; для активации Рах6 в поджелудочной железе необходимо присутствие обоих. **Г.** Когда репортерный ген lacZ (кодирующий β-галактозидазу) соединяют с энхансерами Рах6, отвечающими за его экспрессию в поджелудочной железе и хрусталике/роговице, ферментативная активность β-галактозидазы (синий) наблюдается в этих тканях. (Рис. А–В по данным: A. Visel et al., 2009. *Nature* 461: 199–205.)

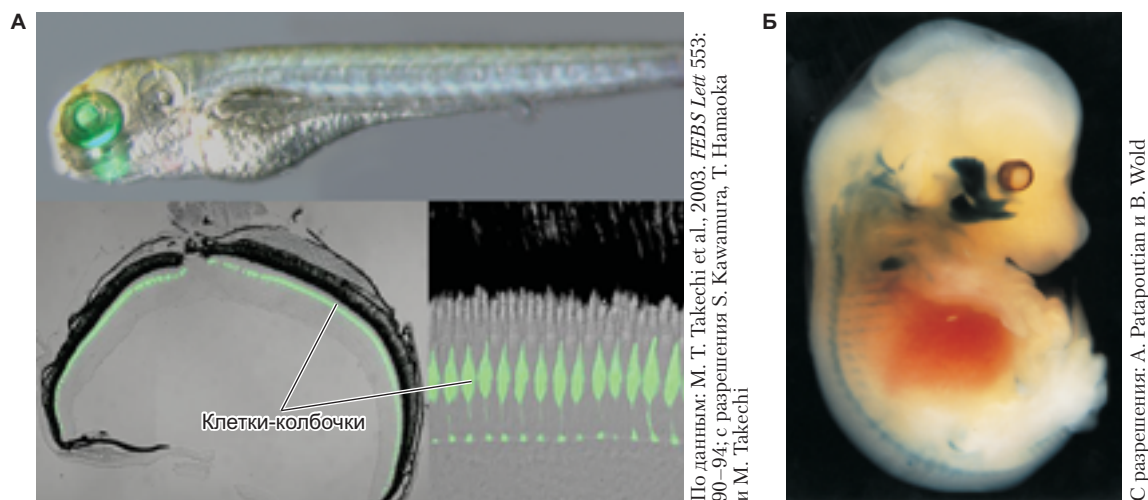


Рис. 3.8. Генетические элементы, регулирующие тканеспецифичную транскрипцию, могут быть идентифицированы путем слияния репортерных генов с предполагаемыми энхансерными областями генов, экспрессирующихся в определенных типах клеток. **А.** Ген GFP соединен с геном, активным лишь в определенных клетках сетчатки *Danio (zebrafish)*. Результатом является экспрессия зеленого флуоресцентного белка в сетчатке малька (*внизу слева*), а точнее, в клетках-колбочках (*внизу справа*). **Б.** Энхансерная область гена, специфичного для мышц белка Myf5, соединена с репортерным геном lacZ, кодирующим β-галактозидазу, и данная конструкция внедрена в мышинный эмбрион. При окрашивании на β-галактозидазную активность (область, окрашенная темным) 13,5-дневного эмбриона мыши видно, что репортерный ген экспрессируется в мышцах глаза, лица, шеи, передних конечностей и сегментах миотом (которые дают начало мускулатуре спины)

САЙЛЕНСЕРЫ

Сайленсеры, известные также как репрессоры, — это регуляторные элементы ДНК, активно подавляющие экспрессию определенного гена. Их можно рассматривать как негативные энхансеры, а осуществляемое ими подавление экспрессии генов может быть пространственным (в определенных типах клеток) и временным (в определенные периоды). К примеру, у мыши есть последовательность ДНК, которая предотвращает активацию промотора во всех тканях, *за исключением* нейронов. Эта последовательность, названная **NRSE** (*neural restrictive silencer element*, нейроспецифичный сайленсерный элемент), была обнаружена в нескольких генах, экспрессия которых ограничена нервной системой: генах, кодирующих синапсин I, натриевый канал типа II, нейротрофический фактор мозга BDNF, Ng-CAM и L1. С NRSE связывается транскрипционный фактор белок **NRSEF** (*neural restrictive silencer factor*, нейроспецифичный сайленсерный фактор). NRSEF, по-видимому, экспрессируется в каждой клетке, *за исключением* зрелых нейронов (Chong et al., 1995; Schoenherr and Anderson, 1995). При удалении NRSE из определенных нейронных генов эти гены экспрессируются в ненейронных клетках (**рис. 3.9**; Kallunki et al., 1995, 1997).

РЕЗЮМЕ ПО ГЕННЫМ РЕГУЛЯТОРНЫМ ЭЛЕМЕНТАМ

Энхансеры и сайленсеры позволяют гену использовать для контроля экспрессии множество транскрип-

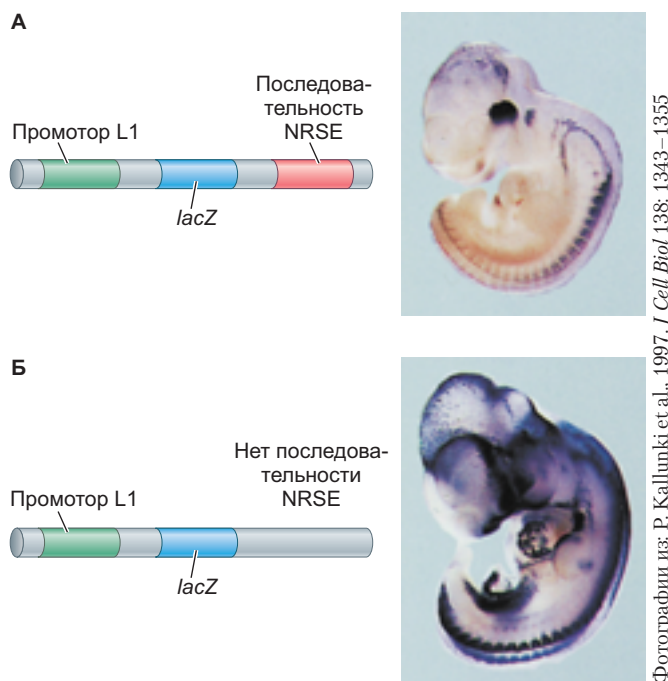


Рис. 3.9. Сайленсер подавляет транскрипцию гена. **А.** Мышиный эмбрион, содержащий трансгенную конструкцию из промотора *L1*, части специфичного для нейронов гена *L1* и гена *lacZ*, соединенного со вторым экзоном *L1*, а также последовательности NRSE. **Б.** Эмбрион на той же стадии, содержащий сходный трансген, но без последовательности NRSE. Темные области выявляют присутствие β-галактозидазы (продукта *lacZ*)

ционных факторов в разных комбинациях, т. е. они *модулярны*. Так, ген *Rax6* регулируют энхансеры, позволяющие ему экспрессироваться в глазу, поджелудочной железе и нервной системе (см. рис. 3.7Б), т. е. функционировать как логический оператор «ИЛИ». Но *внутри каждого цис-регуляторного модуля работа транскрипционных факторов* комбинаторна, так что для транскрипции в хрусталике гена кристаллина требуется определенный набор белков *Rax6*, (L)-*Maf* и *Sox2*; это логический оператор «И». Комбинаторное взаимодействие транскрипционных факторов на энхансерах определяет представленность каждого гена в пространстве и времени (Zinzen et al., 2009; Peter and Davidson, 2015). Так, оператор «И» может играть чрезвычайно важную роль в одновременной активации целых групп генов.

Механизмы дифференциальной экспрессии генов: транскрипция

Из четырех уровней регуляции экспрессии генов (транскрипция, процессинг РНК, синтез белка (трансляция) и посттрансляционные модификации) самый большой набор возможных механизмов регулирует, как и где ген транскрибируется в пре-мРНК. В ходе эмбрионального развития двумя преобладающими механизмами являются: 1) эпигенетическая модификация хроматина; 2) контроль посредством транскрипционных факторов.

Эпигенетические модификации: настройка доступности генов

В самом широком определении термин «**эпигенетика**» (в пер. с др.-греч. *epi* — над, на, в дополнение к) относится к фенотипическим изменениям,

вызванным изменением характера экспрессии гена, а не самой последовательности ДНК. Если последовательность ДНК представляет собой генетическую характеристику клетки, то все факторы (например, белки, ионы, малые молекулы), действующие на ДНК, составляют ее эпигенетическую характеристику. Чаще всего эпигенетические механизмы включают добавление или удаление некоторых из этих факторов, в силу чего меняется трехмерная конфигурация ДНК или ее гистонов.

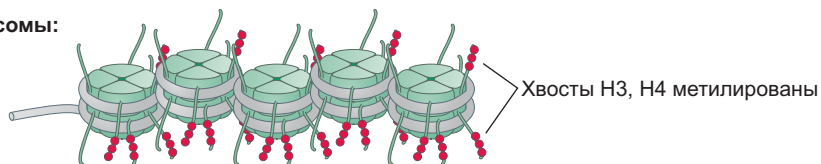
РАЗРЫХЛЕНИЕ И УПЛОТНЕНИЕ ХРОМАТИНА: ГИСТОНЫ КАК ПРИВРАТНИКИ

Важность гистонов в том, что они, по-видимому, могут способствовать экспрессии генов или запрещать ее (рис. 3.10). Контроль репрессии и активации в значительной степени происходит за счет модификации «хвостов» гистонов H3 и H4 двумя малыми органическими группами: метильным (CH_3) и ацетильным (COCH_3) остатками. В целом **ацетилирование гистонов** — добавление к гистонам отрицательно заряженных ацетильных групп — нейтрализует положительный заряд лизина и разрыхляет гистоны, что делает возможным транскрипцию. Ферменты, называемые **ацетилтрансферазами гистонов**, навешивают на них ацетильные группы (особенно на лизины в составе H3 и H4), дестабилизируя плотную упаковку нуклеосом, из-за чего те расходятся (т. е. хроматин по состоянию приближается к *эухроматину*). Нетрудно догадаться, что ферменты, которые *убирают* ацетильные группы (**деацетилазы гистонов**), стабилизируют упаковку хромосом (т. е. хроматин по состоянию приближается к *гетерохроматину*) и предотвращают транскрипцию.

Метилирование гистонов — это добавление к ним метильных групп ферментами, называемыми **метилтрансферазами гистонов**. Хотя метилирование гисто-

Конденсированные нуклеосомы:

Хвосты гистонов
в основном метилированы



Неконденсированные нуклеосомы:

Хвосты гистонов в основном не метилированы,
но ацетилированы

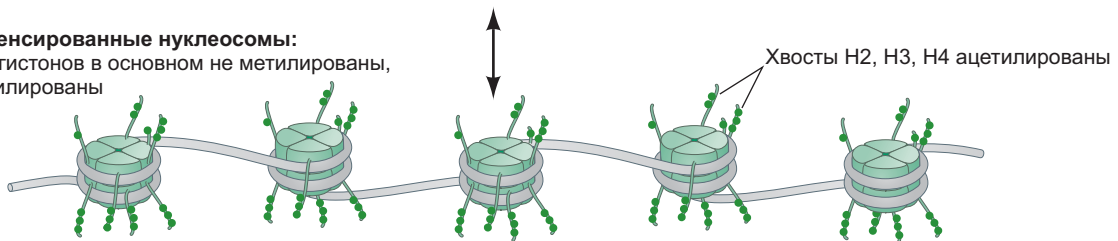


Рис. 3.10. Эпигенетическая регуляция за счет модификации гистонов. Метильные группы приводят к более плотной конденсации нуклеосом, затрудняя доступ к промоторным областям и таким образом предотвращая транскрипцию генов. Ацетилирование разрыхляет упаковку нуклеосом, открывая ДНК для РНК-полимеразы II и транскрипционных факторов, активирующих гены

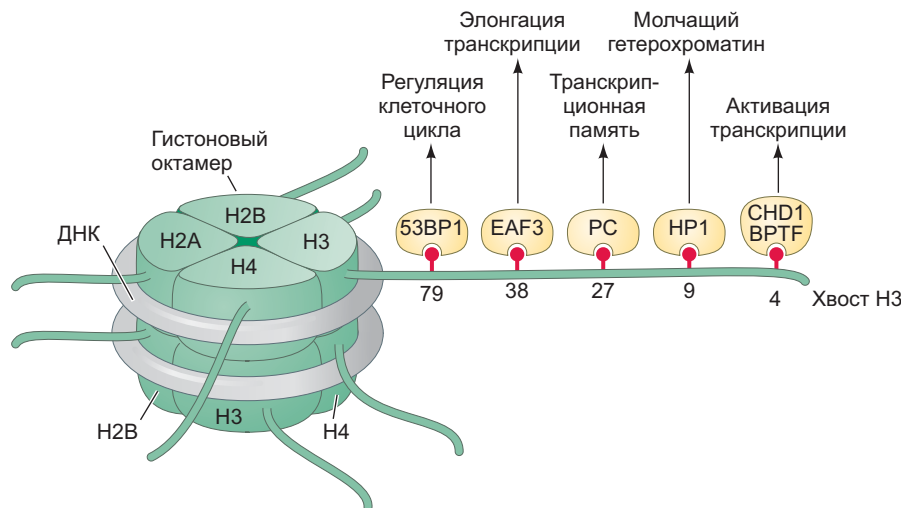


Рис. 3.11. Метилирование гистона H3. Хвост гистона H3 (его аминоконцевая часть, начало белка) выпячивается из нуклеосомы и может подвергаться метилированию и ацетилированию. Лизины в его составе могут метилироваться и распознаваться определенными белками. Метилирование лизиновых остатков в положениях 4, 38 и 79 связано с активацией генов, в то время как метилирование лизинов в положениях 9 и 27 ассоциируется с репрессией. Белки, связывающие эти сайты, изображены над метильными группами (без соблюдения масштаба). (По данным: T. Kouzarides and L. Berger, 2007. Из: *Epigenetics*, C. D. Allis, T. Jenuwein and D. Reinberg [Eds.], pp. 191–209. Cold Spring Harbor Press: New York.)

нов чаще приводит к образованию гетерохроматина и репрессии транскрипции, оно может и активировать транскрипцию в зависимости от того, какая именно аминокислота метилируется, и от присутствующих поблизости метильных и ацетильных групп (Strahl and Allis, 2000; Cosgrove et al., 2004). Например, ацетилирование хвостов H3 и H4 вместе с добавлением трех метильных групп на лизин в четвертом (т. е. H3K4me³; K — аббревиатура для лизина) обычно ассоциируется с активно транскрибируемым хроматином. Напротив, сочетание отсутствия ацетилирования хвостов H3 и H4 с метилированием лизина в девятом положении H3 (H3K9) обычно ассоциируется с сильно репрессированным хроматином (Norma et al., 2001). То же можно сказать и про модификации H3K27 и H4K20. На **рис. 3.11** представлена нуклеосома с остатками лизина в хвосте H3. Модификации этих остатков регулируют транскрипцию.

ХАРАКТЕР МЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНОВ НАСЛЕДУЕТСЯ

Эпигенетический характер метилирования может передаваться из поколения в поколение: он наследуется! Это происходит потому, что модификации гистонов могут задействовать белки, которые сохраняют *память* о состоянии транскрипции из поколения в поколение, пока клетки проходят митозы. К ним относятся белки из семейств **Trithorax** и **Polycomb**. Связываясь с нуклеосомами активных генов, белки Trithorax поддерживают их активность, в то время

как белки Polycomb, связываясь с конденсированными нуклеосомами, поддерживают соответствующие гены в репрессированном состоянии.

Среди белков Polycomb выделяют две категории, которые участвуют в репрессии последовательно. Первый набор белков обладает активностью метилтрансфераз гистонов и метилирует лизины H3K27 и H3K9, подавляя активность генов. У многих организмов это репрессированное состояние стабилизирует второй набор факторов Polycomb, которые связываются с метилированными хвостами H3, поддерживая метилирование на них и метилируя прилегающие нуклеосомы, за счет чего образуются плотно упакованные комплексы репрессии (Grossniklaus and Paro, 2007; Margueron et al., 2009).

Белки Trithorax помогают сохранять память об активности; их роль — противодействовать белкам Polycomb. Одни белки Trithorax могут модифицировать нуклеосомы или менять их положение в хроматине, позволяя транскрипционным факторам связываться с теми участками ДНК, которые раньше были ими закрыты. Другие белки Trithorax поддерживают триметилированное состояние лизина H3K4, предотвращая его деметилирование, ведущее к репрессированному состоянию (Tan et al., 2008).

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК В ПРОМОТОРНЫХ ОБЛАСТЯХ: ВАЖНОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ CpG

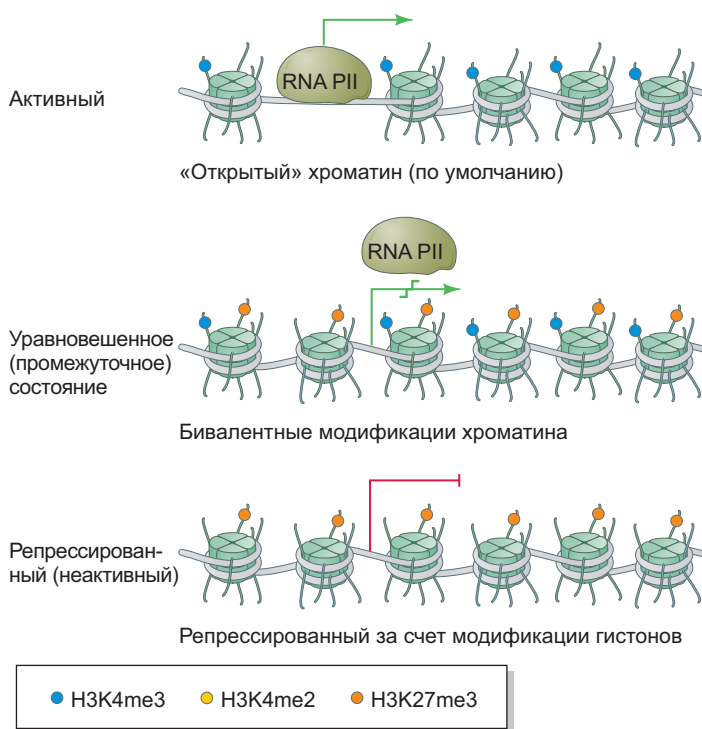
Оказывается, не все промоторы одинаковы. Выделяют два основных класса промоторов, которые ис-

пользуют разные методы контроля транскрипции. Эти типы промоторов определяются по содержанию CpG-последовательностей, по которым может происходить метилирование ДНК. Совершенно верно: метилированию подвергаются не только хвосты гистоновых белков, но и сама ДНК напрямую, и такое метилирование останавливает транскрипцию.

• **Промоторы с высоким содержанием CpG** (high CpG-content promoters, HCP) обычно обнаруживают в «генах контроля развития», где они регулируют синтез транскрипционных факторов и других регуляторных белков, использующихся в *построении* организма (Zeitlinger and Stark, 2010; Zhou et al., 2011). Эти промоторы по умолчанию находятся во включенном состоянии и должны активно подавляться путем метилирования *гистонов* (рис. 3.12А).

• **Промоторы с низким содержанием CpG** (low CpG-content promoters, LCP) обычно обнаруживают в генах, чьи продукты характерны для зрелых клеток (например, глобины красных кровяных клеток, гормоны поджелудочной железы, ферменты, осуществляющие нормальные повседневные функции клетки). Эти промоторы по умолчанию находятся в выключенном состоянии, но могут быть активированы транскрипционными факторами (рис. 3.12Б). CpG-островки в этих промоторах обычно метилированы, и метилирование играет важнейшую роль в предотвращении транскрипции. Когда с CpG-островков снимается метилирование, связанные с промотором гистоны проходят модификацию H3K4me3 и разрыхляют упаковку таким образом, что становится возможным связывание РНК-полимеразы II и транскрипции.

А Промоторы с высоким содержанием CpG



Б Промоторы с низким содержанием CpG

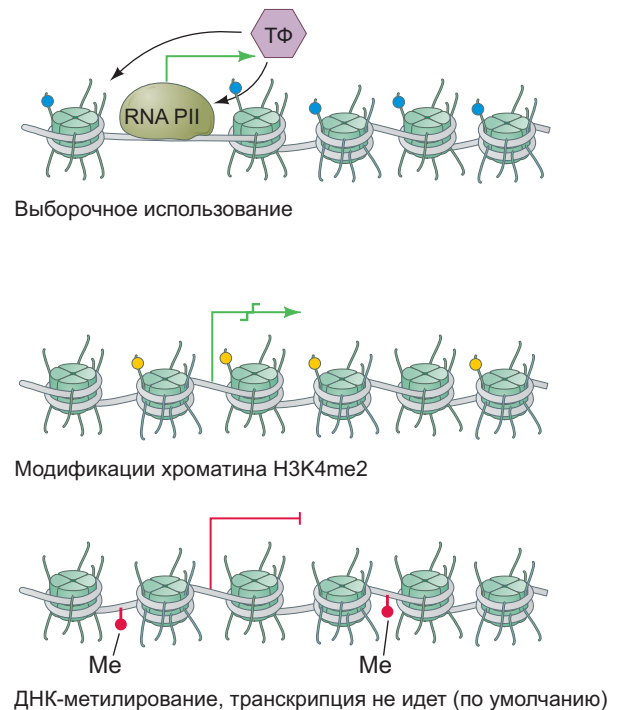


Рис. 3.12. Регуляция хроматина в промоторах HCP и LCP. Промоторы с высоким и низким содержанием CpG регулируются по-разному. **А.** HCP обычно находятся в активном состоянии, их ДНК не метилирована, а нуклеосомы богаты H3K4me3. Открытый хроматин позволяет РНК-полимеразе II связываться с ДНК. Промежуточное состояние HCP бивалентно, в нем присутствуют как активированные (H3K4me3), так и репрессивные (H3K27me3) модификации нуклеосом. РНК-полимераза II может связываться, но не осуществлять транскрипцию. Репрессированное состояние характеризуется репрессивными модификациями гистонов в отсутствие масштабного метилирования ДНК. **Б.** У активных LCP, как и у активных HCP, нуклеосомы богаты H3K4me3, а уровень метилирования низок, однако им требуется стимуляция транскрипционными факторами (ТФ). LCP в промежуточном состоянии способны активироваться под действием транскрипционных факторов и обладают относительно неметилированной ДНК и нуклеосомами, богатыми H3K4me2. В обычном состоянии LCP подавлены за счет метилирования ДНК и нуклеосом, богатых H3K27me3. (По данным: V. W. Zhou et al., 2011. *Nat Rev Genet* 12: 7–18.)

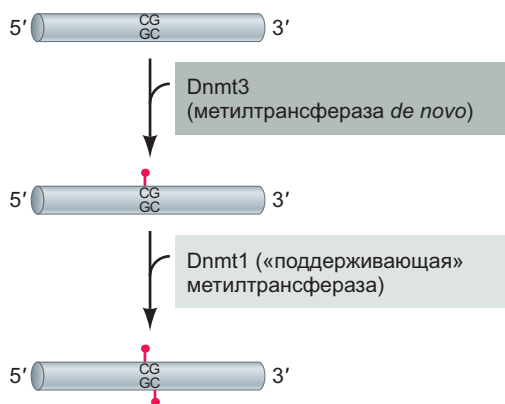


Рис. 3.13. Для модификации ДНК решающее значение имеют две метилтрансферазы. *De novo* метилтрансфераза Dnmt3 способна присоединять метильные группы к неметилированным цитозинам. «Поддерживающая» метилтрансфераза Dnmt1 распознает метилированный цитозин на одной цепи и метилирует С в паре CG на комплементарной цепи

ХАРАКТЕР МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК НАСЛЕДУЕТСЯ

Среди прочих ферментов MeCP2 привлекает к хроматину ДНК-метилтрансферазу-3 (Dnmt3). Этот фермент метилирует ранее неметилированные цитозины на ДНК. Таким образом можно репрессировать относительно обширную область. Новообразованный характер метилирования далее может передаваться следующему поколению ДНК метилтрансферазой-1 (Dnmt1). Этот фермент распознает метилированные цитозины на одной цепи ДНК и размещает метильные группы на комплементарной цепи сразу после ее синтеза (**рис. 3.13**; Bird, 2002; Burdge et al., 2007). Вот почему необходимо, чтобы в последовательности ДНК рядом с С шел нуклеотид G. За счет этого характер метилирования ДНК может сохраняться с каждым клеточным делением. Вновь синтезированная (неметилированная) цепь ДНК должным образом метилируется, когда Dnmt1 связывается с метилированным С старой последовательности CpG и метилирует цитозин последовательности CpG комплементарной цепи. Таким образом, после установления в клетке характера (патерна) метилирования ДНК он может стабильно передаваться ее потомкам.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И ГЕНОМНЫЙ ИМПРИНТИНГ

Метилирование ДНК помогло объяснить как минимум одно весьма загадочное явление — геномный импринтинг (Ferguson-Smith, 2011). Предполагается, что гены, наследуемые от отца и матери, эквивалентны. Собственно, само расщепление по Менделю (и его анализ с помощью решеток Пеннета) основан

на том, что происхождение гена (из сперматозоида он или из яйцеклетки) не имеет значения. Однако, если гены из сперматозоидов и яйцеклеток метилированы по-разному, происхождение *может* иметь значение. У млекопитающих есть примерно 100 генов, в случае которых так и происходит (данные Международного консорциума по эпигеному человека)¹. В этих случаях хромосомы самца и самки не эквивалентны; экспрессироваться может только ген, полученный из яйцеклетки, или ген, полученный из сперматозоида. Таким образом, при наследовании мутантного аллеля от одного родителя может развиваться тяжелое или летальное состояние, но при наследовании того же самого мутантного аллеля от другого родителя никаких тяжелых последствий не возникнет. В некоторых таких случаях выключение генов происходит за счет метилирования ДНК. Метильные группы размещаются на ДНК в ходе сперматогенеза и оогенеза группой ферментов, которые сначала удаляют метильные группы с хроматина, а затем формируют новые, в зависимости от пола (Ciccone et al., 2009; Gu et al., 2011).

Транскрипционные факторы регулируют транскрипцию генов

Научный журналист Натали Анжье (1992) писала, что серия новых открытий указывает на то, что ДНК больше похожа на некоторых политиков, окруженных стойкой белковых советчиков и консультантов, которые должны крутить ее и так и этак, а порой даже изобретать заново, прежде чем от нашего генерального плана тела будет хоть какой-то прок. Этими «советчиками и консультантами» являются транскрипционные факторы. Во время развития они играют ключевую роль во всех аспектах эмбриогенеза. В любой непонятной ситуации сваливай все на транскрипционные факторы! Политики тоже часто используют такой подход.

СЕМЕЙСТВА И ГРУППЫ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ

Транскрипционные факторы можно группировать в семейства на основании сходства их ДНК-связывающих доменов (**табл. 3.1**). ДНК-связывающие области транскрипционных факторов одного семейства устроены по одной и той же схеме, а небольшие различия в аминокислотной последовательности сайтов связывания позволяют им распознавать различные последовательности ДНК. Как уже упоминалось, транскрипционные факторы могут регулировать экспрессию генов, привлекая ферменты модификации гистонов,

¹ Список импринтированных генов мыши можно найти по адресу: www.mousebook.org/all-chromosomes-imprinting-chromosome-map

ТАБЛИЦА 3.1. Некоторые семейства и подсемейства транскрипционных факторов

Семейство	Представляющие его транскрипционные факторы	Некоторые их функции
С гомеодоменом:		
Нох	Нохa1, Нохb2 и др.	Формирование оси тела
POU	Pit1, Unc-86, Oct2	Развитие гипофиза; путь развития нейронных клеток
Lim	Lim1, Forkhead	Развитие головы
Рах	Рах1, 2, 3, 6, 7 и др.	Нейральная спецификация; развитие глаз и мышц
С доменом спираль–петля–спираль (basic helix–loop–helix, bHLH)	MyoD, MITE, daughterless	Спецификация мышц и нервов; определение пола у <i>Drosophila</i> ; пигментация
С лейциновой застёжкой (basic leucine zipper, bZip)	cEBP, AP1, MITE	Дифференцировка печени; спецификация жировых клеток
С цинковыми пальцами:		
Стандартные	WT1, Krüppel, Engrailed	Развитие почек, гонад и макрофагов; сегментация у <i>Drosophila</i>
Ядерные рецепторы гормонов	Рецепторы глюкокортикоидов, эстрогена, тестостерона, ретиноевой кислоты	Вторичное определение пола; развитие черепно-лицевых структур; развитие конечностей
Sry-Sox	Sry, SoxD, Sox2	Изгибы ДНК; первичное определение пола у млекопитающих; дифференцировка эктодермы
MADS-box	Классы А, В, С, D, Е	Определение органов цветка

стабилизируя активность РНК-полимеразы и координируя время синтеза РНК с многочисленных генов.

Транскрипционные факторы привлекают ферменты модификации гистонов. Как вы уже знаете, такие регуляторные элементы ДНК, как энхансеры и сайленсеры, действуют путем связывания с транскрипционными факторами, и в каждом элементе могут присутствовать сайты связывания нескольких факторов. Посадка транскрипционного фактора на регуляторный элемент ДНК происходит за счет одного белкового сайта, а другие используются для взаимодействия с остальными транскрипционными факторами и белками, служащими для привлечения ферментов модификации гистонов. К примеру, когда (см. табл. 3.1) транскрипционный фактор MITE, необходимый для развития ушей и выработки пигмента, связывается с определенной последовательностью ДНК, он связывает и ацетилтрансферазу гистонов, которая способствует диссоциации нуклеосом, делая возможной транскрипцию (Ogryzko et al., 1996; Price et al., 1998)¹. Другим транскрипционным фактором, ведущим к регуляции сборки хроматина, является Рах7 в предшественниках мышечных клеток (см. табл. 3.1). В данном случае Рах7 привлекает комплекс метилтрансфераз Trithorax, который метилирует лизин в положении 4 гистона H3 (H3K4), что

приводит к *триметилированию* лизина и *активации* транскрипции (Adkins et al. 2004; Li et al., 2007; McKinnell et al., 2008).

Транскрипционные факторы стабилизируют полимеразу. Помимо привлечения ферментов модификации гистонов, транскрипционные факторы могут регулировать экспрессию генов, стабилизируя преинициаторный комплекс, который позволяет РНК-полимеразе II связываться с промотором (см. рис. 3.6). Например, транскрипционный фактор MyoD (см. табл. 3.1), необходимый для развития мышечных клеток, стабилизирует TFIIIB, удерживающий РНК-полимеразу II на промоторе (Heller and Bengal, 1998).

Некоторые транскрипционные факторы координируют и синхронизируют экспрессию множества генов. Одновременную экспрессию множества специфичных для клетки генов объясняет связывание ключевых транскрипционных факторов с большим количеством энхансерных элементов. Например, множество различных генов, специфично активирующихся в хрусталике, содержат энхансер, связывающий Рах6. Возможно, что каждый из этих генов хрусталика уже собрал весь необходимый набор транскрипционных факторов на энхансерах и готов к активации экспрессии, но транскрипция не пойдет, пока не произойдет связывания с Рах6, после чего начнется координированная экспрессия множества генов хрусталика (другие примеры см. в работе Davidson, 2006).

¹ MITE — транскрипционный фактор, ассоциированный с микрофтальмией (microphthalmia-associated transcription factor).



Загадки развития

В развитии эмбриона точное связывание транскрипционных факторов с цис-регуляторными элементами управляет дифференциальной экспрессией генов в пространстве и времени. Обусловлена ли идентичность клетки связыванием одного транскрипционного фактора с отдельным регуляторным элементом, ведущим к экспрессии одного гена? Сколько генов требуется, чтобы определить путь конкретной клетки?

ЗАТРАВОЧНЫЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ: НАРУШАЯ ТИШИНУ

Обнаружение энхансера — непростая задача, поскольку ДНК обычно настолько скручена, что энхансерные области недоступны. Как транскрипционный фактор находит сайт связывания в энхансере, при условии, что энхансер может быть закрыт нуклеосомой? Внедрением в репрессированный хроматин и связыванием энхансерных элементов ДНК занимаются особые транскрипционные факторы (Cirillo et al., 2002; Berkes et al., 2004). Они были названы **затравочными транскрипционными факторами** (pioneer transcription factors), а их исключительное занятие — связывание ДНК, плотно намотанной на нуклеосомы в составе гетерохроматина (Iwafuchi-Doi, 2019). Как следует из названия, затравочные факторы первыми приступают к процессу подготовки локуса к транскрипции. Они, по-видимому, необходимы также для спецификации некоторых клеточных линий. Например, известный затравочный транскрипционный фактор FoxA1 чрезвычайно важен в спецификации развития клеток печени. FoxA1 связывает определенные энхансеры, отвечающие за развитие печени, и разрыхляет хроматин, открывая другим транскрипционным факторам доступ к промотору (Lupien et al., 2008; Smale, 2010). Более того, FoxA1 остается связанным с ДНК даже во время митоза, обеспечивая механизм восстановления нормальной транскрипции в презумптивных клетках печени (Zaret et al., 2008). Pax7 тоже считают затравочным транскрипционным фактором; как упоминалось выше, он поддерживает мышечную спецификацию, привлекая комплекс метилтрансфераз Trithorax, активирующих транскрипцию (McKinnell et al., 2008).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ЗАТРАВОЧНЫЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ, СПОСОБНЫЕ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАТЬ КЛЕТОЧНУЮ ИДЕНТИЧНОСТЬ

Вспомните основополагающий опыт Джона Гердона по клонированию (1962), в котором внесение ядра соматической клетки в энуклеированный

ооцит *репрограммировало* геном соматической клетки — в данном случае в сторону полноценного развития взрослой лягушки! Хотя тот эксперимент обеспечил первое значимое свидетельство в пользу геномной эквивалентности, он не показал, какие белки в цитоплазме ооцита были ответственны за репрограммирование. Подсказка появилась в 2006 г., когда Синъя Яманака составил список генов, задействованных в поддержании незрелого состояния клеток раннего эмбриона мыши. Незрелые клетки происходили из внутренней массы бластоцисты (эквивалент бластулы амфибий у млекопитающих) (см. гл. 5). В лаборатории Яманаки экспериментально добились экспрессии всего четырех генов (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4*) в дифференцированных фибробластах мыши и обнаружили, что фибробласты *дедифференцировались* в клетки, подобные клеткам внутренней клеточной массы бластоцисты (**рис. 3.14**; Takahashi and Yamanaka, 2006). Способность репрограммировать путь развития клеток в большей степени зависит от генов *Sox2*, *Oct3/4* и *Klf4*, так как они могут взаимодействовать и связываться с закрытым хроматином, т. е. действовать как затравочные транскрипционные факторы (Soufi et al., 2012). Потом было показано, что в культуре из дифференцированных клеток можно получить любые клеточные типы эмбриона. Это доказывает, что они являются плюрипотентными, а поскольку данное состояние возникает у них индуцированно, они были названы **индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК)**. За свои открытия Яманака и Гердон в 2012 г. получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине, а ИПСК теперь используют для изучения развития и заболеваний человека способами, которые были невозможны до этого (см. гл. 5).

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЕНОВ ОРГАНОВ ЦВЕТКА

Чтобы растение произвело цветок, необходимо поменять генетическую программу апикальной меристемы побега (АМП) с образования листьев на образование репродуктивных частей цветка. Белки Polcomb подавляют развитие цветков, а белки Trithorax снимают эту репрессию. Однако как происходит спецификация различных частей цветка после снятия репрессии его развития? *«Когда сомневаешься...»*

Гены, способствующие определению органов цветка, кодируют **транскрипционные факторы с MADS-боксом** — семейство белков, встречающихся в разнообразных группах эукариот и обладающих консервативным мотивом в ДНК-связывающем домене. У цветковых растений пять классов генов участвуют в определении органов цветка: А, В, С, D и Е (**рис. 3.15**; см. гл. 6). Эти гены определяют

идентичность каждого органа цветка, экспрессируясь в различных комбинациях.

Внимательно взглянув на расположение органов цветка — плодolistиков, тычинок, лепестков и чашелистиков, можно заметить, что они организованы в четыре **мутовки**, концентрические круги ткани, окружающие верхушку осевой меристемы (рис. 3.16). Экспрессия генов класса А вместе с генами класса Е индуцирует первую мутовку к дифференцировке в чашелистики; индукция лепестков из второй мутовки вызвана экспрессией генов классов А, В и Е; образование тычинок из третьей мутовки индуцирует экспрессия генов классов В, С и Е; четвертая мутовка образует плодolistики, будучи индуцирована генами классов С и Е (см. рис. 3.16). Примечательно то, что все разнообразие форм цветка, характерное для покрытосеменных, обусловлено пересечением или комбинаторным взаимодействием такого относительно небольшого количества генов определения органов цветка (Theißen et al., 2016).

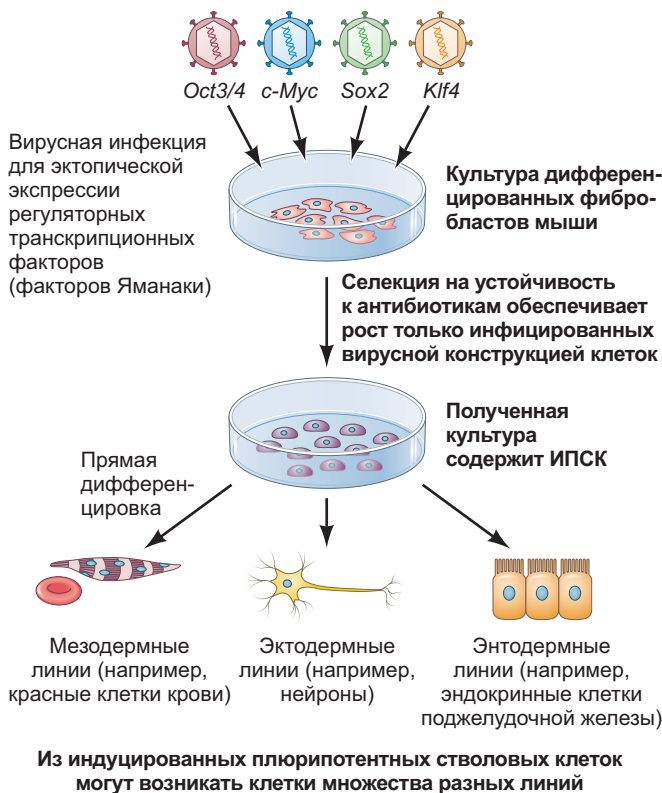
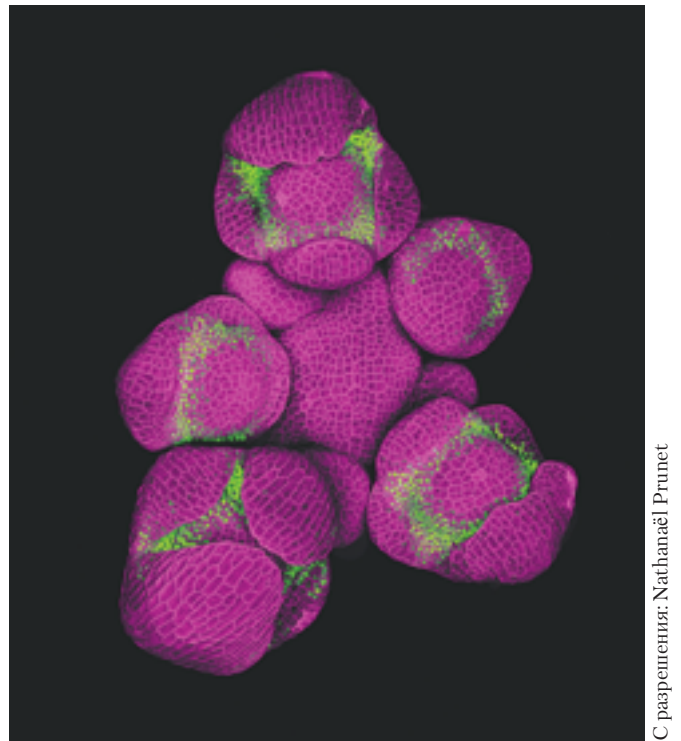


Рис. 3.14. Переход от дифференцированного фибробласта к ИПСК с помощью четырех транскрипционных факторов. Если с помощью вирусной инфекции доставить в фибробласты факторы Яманаки (гены транскрипционных факторов *Oct3/4*, *c-Myc*, *Sox2* и *Klf4*), эти клетки дедифференцируются в ИПСК. Как и эмбриональные стволовые клетки, ИПСК способны давать потомков, относящихся к любому из трех зародышевых листков (мезодерме, эктодерме и энтодерме)

Важно, что помимо индукции чашелистиков и плодolistиков гены классов А и С соответственно активно подавляют экспрессию друг друга (рис. 3.16А, *справа*). Такая перекрестная репрессия генов, контролирующая альтернативные пути развития клеток, укрепляет границу между двумя тканями и является общим механизмом, то и дело встречающимся в развитии животных и растений.

Белковые продукты упомянутых генов определения органов цветка — транскрипционные факторы с MADS-боксом — действуют как гомеозисные регуляторы пути развития клеток. Утрата функции генов из классов А, В или С вызывает **гомеозисные трансформации** цветка или замены одних структур другими, что не оказывает влияния на инициацию его развития (рис. 3.16Б–Г). Например, утрата гена *AGAMOUS1* класса С у *Arabidopsis thaliana* приводит к замене тычинок и плодolistиков на лепестки и чашелистики. А вот утрата гена *APETALA2-2* класса А, наоборот, приводит к дупликации плодolistиков и тычинок за счет лепестков и чашелистиков. В поисках новых видов цветения садоводы непреднамеренно



С разрешения: Nathanaël Prunet

Рис. 3.15. Флуоресцентное изображение живой меристемы соцветия *Arabidopsis thaliana*, меченой связывающим мембраны йодистым пропидием (малиновый цвет) и экспрессирующей GFP, соединенный с геном класса В (*APETALA3*; зеленый цвет). На изображении большие выпуклости на периферии — это развивающиеся цветки, а зеленая флуоресценция выявляет области, которые станут пестиками и тычинками (мутовки 2 и 3) каждого цветка. Почкообразные клеточные массы в пределах цветка — это развивающиеся органы



Рис. 3.17. $A + B - C$ = прекрасные двойные розы. Изображение дикой розы с одиночным цветком и схемой экспрессии генов ABC (*слева*). Культурные розы с полудвойным (*в середине*) и двойным (*справа*) цветком были выведены в нескольких раундах селекции, уменьшившей домен экспрессии ортолога *AGAMOUS1* розы (гена класса C), что обеспечило расширение домена экспрессии гена класса A. В результате получилось больше лепестков и меньше тычинок. Ч — чашелистик; Л — лепесток; Т — тычинка; П — плодolistик. (По данным: A. Dubois et al., 2010. *PLOS One* 5: e9288/CC BY 4.0.)

Загадки развития

Как же в реальности определить ГРС, работающую в отдельной клетке? Это вызов ученым как с концептуальной, так и с технической точки зрения. Число генов, включающихся и выключающихся (не говоря уже о различиях в скорости и уровне экспрессии) в заданной ГРС, устрашающе огромно. Первым препятствием является получение точной картины экспрессии генов; методы преодоления его описаны ниже в этой главе. Далее эти гены необходимо организовать в логичную сеть, используя экспериментально определенные функции. Что можно выяснить, сравнивая ГРС в клетках из отдельных областей эмбриона на разных стадиях развития, под действием различных условий или даже принадлежащих к разным видам? Если говорить коротко, то многое, и эти данные представляют собой передний край генетики развития.

проводили отбор по мутациям в регуляторных областях, контролирующих домены экспрессии разных классов генов с MADS-боксом. Изобилие лепестков, наблюдаемое нами сегодня у многих культурных роз, обязано селекции мутаций, которые меняют домен экспрессии таких генов класса С как *AGAMOUS1* (рис. 3.17; Dubois et al., 2010). Таким образом, даже мелкие изменения характера экспрессии этого небольшого набора затравочных транскрипционных факторов у растений вносят свой вклад в наблюдаемое ныне разнообразие форм цветка.

Генная регуляторная сеть: определение отдельных клеток

Надеемся, что к этому моменту вам уже вполне ясно, что различные клеточные типы представляют собой результат дифференциальной экспрессии

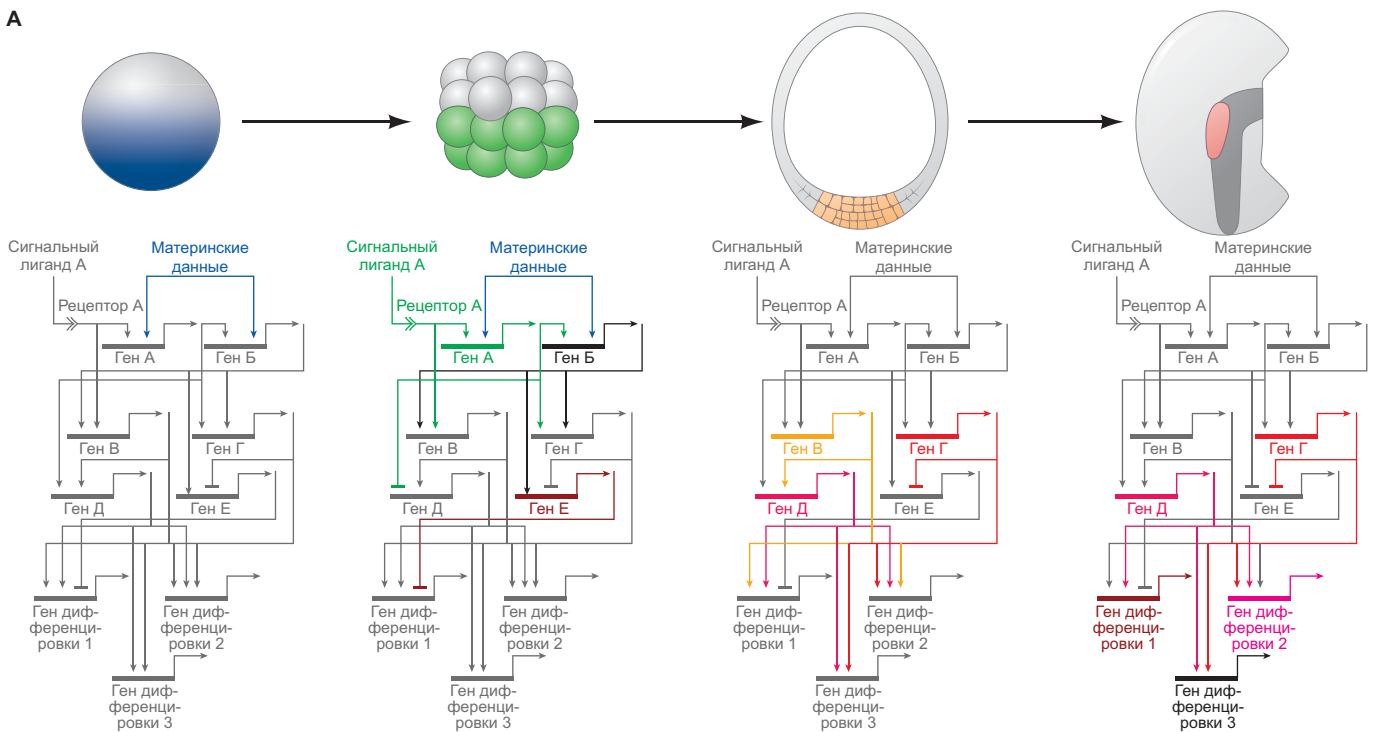


Рис. 3.18. Генная регуляторная сеть энтодермальных линий в эмбрионе морского ежа. **А.** Схематичное изображение четырех стадий развития эмбриона морского ежа, показывающее постепенную спецификацию энтодермальных клеток (*сверху*) и соответствующую модель генной регуляции в ходе этой спецификации от вклада материнских факторов и сигналов до затравочных транскрипционных факторов и генов финальной дифференцировки (*снизу*). **Б.** Двойная флуоресцентная *in situ* гибридизация через 24 ч после оплодотворения, на которой видно, что экспрессия *hox11/13b* ограничена только клетками, происходящими из *veg1* (красный), в то время как экспрессия *foxa* ограничена потомками *veg2* (зеленый). (Рис. А по данным: V. F. Hinman and A. M. Cheate Jarvela, 2014. *Genesis* 52: 193–207.)

Из I. S. Peter and E. H. Davidson, 2011. *Nature* 474: 635–639

генов. Хотя затравочные транскрипционные факторы необходимы для инициации процесса, одних их недостаточно для воплощения полной геномной программы.

Изучая развитие морского ежа, исследователи начали показывать способы регуляции ДНК для определения клеточного типа и направления морфогенеза развивающегося организма. Группа Эрика Дэвидсона первой применила подход сетевой модели, в которой *цис*-регуляторные элементы (такие как промоторы и энхансеры) связаны в логичную схему транскрипционными факторами (рис. 3.18; см. <http://sugp.caltech.edu/endomes>; Davidson and Levine, 2008; Oliveri et al., 2008). Первые входные данные на эту сеть поступают от материнских транскрипционных факторов в цитоплазме ооцита; с этого момента сеть выстраивается самостоятельно: 1) за счет способности материнских транскрипционных факторов распознавать *цис*-регуляторные элементы определенных генов, кодирующих другие транскрипционные факторы; 2) за счет способности нового набора транскрипционных факторов инициировать паракринные сигнальные пути, активирующие или ингибирующие другие транскрипционные факторы в соседних клетках (рис. 3.18А).

Эти исследования показывают регуляторную логику взаимодействия генов морского ежа в ходе спецификации и возникновения характерных клеточных типов. Набор взаимосвязей генов спецификации клеточных типов называют **геной регуляторной сетью** (ГРС) (термин, предложен группой Дэвидсона). Таким образом, каждую клеточную линию и, весьма вероятно, любую отдельную клетку определяет та ГРС, которая активна в ней в данный момент времени.

Эмбриональное развитие — это невероятного масштаба перенос информации, в ходе которого данные, содержащиеся в последовательности ДНК, создают и направляют развертывание специфичных клеточных функций на уровне всей системы.

Е. Н. Davidson (2010)

Механизмы дифференциальной экспрессии генов: процессинг пре-мРНК

Регуляция экспрессии генов не ограничена дифференциальной транскрипцией ДНК. Если определенный РНК-транскрипт синтезируется, нет гарантии, что на его основе в клетке будет синтезирован функциональный белок. Для образования активного белка пре-мРНК должна быть: 1) обработана с образованием матричной РНК путем удаления интронов; 2) перемещена из ядра в цитоплазму; 3) транслирована с помощью аппарата синтеза белка.

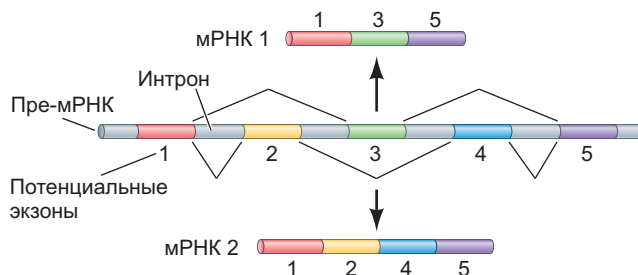


Рис. 3.19. Дифференциальный процессинг пре-мРНК. Согласно общепринятой практике, варианты сплайсинга обозначают тонкими V-образными линиями. Дифференциальный сплайсинг может преобразовать одинаковые пре-мРНК в разные мРНК, выборочно используя разные экзоны

Дифференциальный процессинг пре-мРНК — это **сплайсинг** (разрезание, перестановка и сшивание участков) предшественника пре-мРНК на отдельные матрицы, представляющие собой разные комбинации потенциальных экзонов и определяющие различные белки. Если в предшественнике пре-мРНК было пять потенциальных экзонов, в клетках одного типа могут быть задействованы экзоны 1, 2, 4 и 5; в клетках другого типа путем сплайсинга могут объединяться экзоны 1, 3 и 5; а в клетках третьего типа могут быть собраны все экзоны сразу (рис. 3.19). Таким образом, с одного гена может быть получено целое семейство белков. Различные белки, кодируемые одним и тем же геном, называют **сплайс-изоформами** белка.

Создание семейств белков путем альтернативного сплайсинга пре-мРНК

Альтернативный сплайсинг пре-мРНК — молекулярный механизм, обеспечивающий продукцию большого разнообразия белков одного и того же гена. У растений это способ регулировать приспособленность к условиям среды. Например, у *Arabidopsis thaliana* транскрипты *FLOWERING LOCUS M (FLM)* могут проходить сплайсинг по-разному в зависимости от окружающей температуры, что приводит к образованию двух различных белков, которые участвуют в контроле времени цветения (Shang et al., 2017). У позвоночных большинство генов процессируют пре-мРНК альтернативным сплайсингом (Wang et al., 2008; Nilsen and Graveley, 2010)¹. Критически важный первый шаг в альтер-

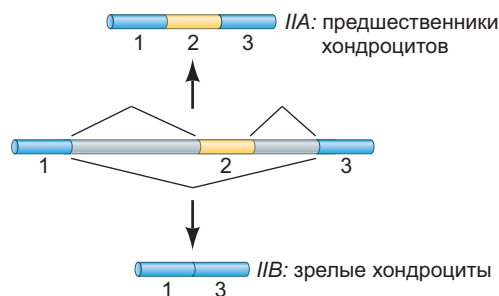
¹ Мутации могут создавать видоспецифичные события сплайсинга, а тканеспецифичные различия сплайсинга пре-мРНК у позвоночных встречаются в 10–100 раз чаще, чем изменения в транскрипции генов (Barbosa-Morais et al., 2012; Merkin et al., 2012).

нативном сплайсинге пре-мРНК — распознавание последовательности как экзона или интрона, которое может происходить несколькими способами. Большинство генов содержит **консенсусную последовательность** на 5'- и 3'-концах интронов. Эти последовательности — «сайты сплайсинга» интронов. Сплайсинг пре-мРНК опосредуют комплексы, известные как **сплайсосомы**, связывающиеся с сайтами сплайсинга. Сплайсосомы состоят из малых гетерогенных ядерных РНК и белков, называемых **факторами сплайсинга**, которые связываются с сайтами сплайсинга или прилежащими к ним областями. Производя специфичные факторы сплайсинга, клетки могут различаться по способности распознавать некую последовательность как интрон, т. е. последовательность, которая является *экзоном* в клетках одного типа, может быть *интроном* в клетке другого типа (**рис. 3.20А, Б**). В других случаях факторы в одной клетке могут распознавать различные 5'-сайты (в начале интрона) или различные 3'-сайты (в конце интрона; **рис. 3.20В, Г**).

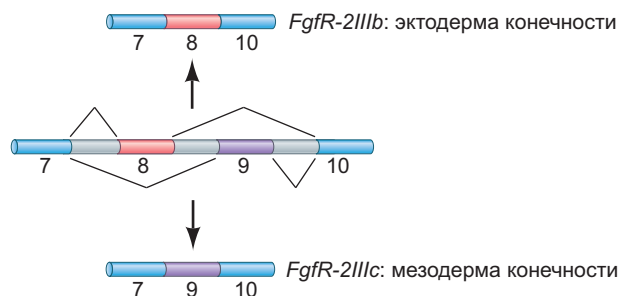
В некоторых случаях в результате альтернативного сплайсинга мРНК образуются белки, которые играют близкие, но все же различные роли в отдельных клетках. Например, изоформа WT1 без дополнительного экзона служит транскрипционным фактором в ходе развития почек, в то время как изоформа с дополнительным экзоном, по-видимому, необходима для развития семенников (Hammes et al., 2001; Hastie, 2001).

То, как ген проходит сплайсинг, может быть для клетки вопросом жизни и смерти. С гена *Bcl-x* за счет альтернативного сплайсинга может синтезироваться большой или малый белок. Если определенный участок ДНК используется как экзон, производится «большой белок Bcl-X», или Bcl-X_L (**см. рис. 3.20В**). Этот белок ингибирует программируемую клеточную гибель. Однако если данную последовательность рассматривать в качестве интрона и вырезать, будет произведен «малый белок Bcl-X» (Bcl-X_S), который *индуцирует* клеточную гибель. Во многих опухолях содержание Bcl-X_L необычно высоко (Akgul et al., 2004; Kędzierska et al., 2017).

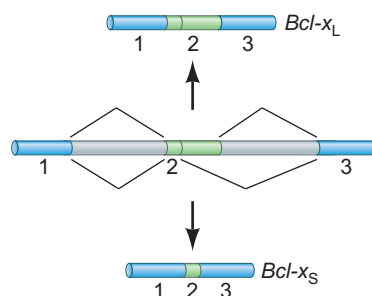
А Кассетный экзон: проколлаген типа II



Б Взаимоисключающие экзоны: FgfR2



В Альтернативные 5'-сайты сплайсинга: Bcl-x



Г Альтернативные 3'-сайты сплайсинга: Chordin

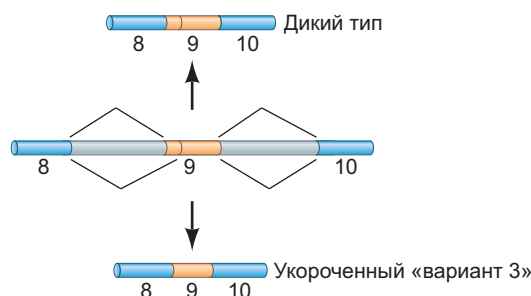


Рис. 3.20. Примеры альтернативного сплайсинга пре-мРНК. Серым цветом выделены интроны; все другие цвета обозначают экзоны. Варианты альтернативного сплайсинга показаны V-образными линиями. **А.** «Кассета» (желтый), которая может быть использована в качестве экзона или вырезана как интрон, отличает коллаген II типа в предшественниках хондроцитов и зрелых хондроцитах (клетках хряща). **Б.** Взаимоисключающие экзоны отличают рецепторы фактора роста фибробластов в эктодерме конечностей от тех, что обнаруживают в мезодерме конечностей. **В.** Альтернативный выбор 5'-сайта сплайсинга, благодаря которому создаются, например, большая и малая изоформы белка Bcl-X. **Г.** Альтернативный выбор 3'-сайта сплайсинга используется для образования нормальной и укороченной формы хордина. (По данным: A. N. McAlinden et al., 2004. *Birth Def Res C* 72: 51–68.)

Механизмы дифференциальной экспрессии генов: трансляция мРНК

Сплайсинг пре-мРНК тесно взаимосвязан с ее транспортом через ядерные поры в цитоплазму. После удаления интронов со сплайсосомой связываются специфичные белки, присоединяющие комплекс РНК — сплайсосома к ядерным порам (Luo et al., 2001; Strässer and Hurt, 2001). Кроме того, заменяются белки, закрывающие 5'- и 3'-концы РНК. Ядерный кэп-связывающий белок на 5'-конце заменяется *эукариотическим фактором инициации 4E* (eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E), а поли-А-хвост связывается с цитоплазматическим поли-А-связывающим белком. Хотя оба изменения способствуют инициации трансляции, нет гарантии, что эта мРНК будет транслирована после перемещения в цитоплазму. Контроль экспрессии генов на уровне трансляции может осуществляться множеством способов; некоторые из наиболее важных описаны ниже.

Дифференциальная стабильность мРНК

Чем дольше сохраняется мРНК, тем больше белка может быть с нее транслировано. Если матрица с относительно коротким временем полураспада избирательно стабилизируется в определенных клетках в определенное время, то соответствующий ей белок будет образован в больших количествах именно в этом месте и в это время.

Стабильность матрицы зачастую определяет длина ее поли-А-хвоста. Длина, в свою очередь, зависит в основном от последовательностей 3'-нетранслируемой области, часть из которых позволяют сформировать более длинный поли-А-хвост. Если экспериментально заменить такие 3'-НТО, время полураспада образовавшихся мРНК меняется: те, что раньше жили долго, быстро разрушаются, а обычно неустойчивые мРНК сохраняются в течение более долгого времени (Shaw and Kamen, 1986; Wilson and Treisman, 1988; Decker and Parker, 1995). В некоторых случаях мРНК избирательно стабилизируются в определенное время в отдельных клетках. В ходе развития нервной системы набор РНК-связывающих белков, называемых **Нубелками** (HuA, HuB, HuC и HuD), стабилизирует две группы мРНК, которые в других условиях быстро исчезают (Perrone-Bizzozero and Bird, 2013). Одна группа целевых мРНК кодирует белки, которые останавливают деление предшественников нейрональных клеток, а другая группа мРНК кодирует белки, запускающие нейрональную дифференцировку (Okano and Darnell, 1997; Deschênes-Furry et al., 2006, 2007). Таким образом, как только произ-

водятся белки Hu, предшественники нейрональных клеток становятся нейронами¹.

мРНК, запасенные в ооцитах: избирательное ингибирование трансляции мРНК

Примечательные случаи регуляции экспрессии генов на уровне трансляции имеют место в ооцитах. Перед мейозом, пока ооцит все еще находится в яичнике, в нем часто производится и запасается мРНК, которая будет использована только после оплодотворения. Эти матрицы остаются в покоем состоянии до активации ионными сигналами (см. гл. 6 и 7) и распространяются по яйцу в ходе овуляции или оплодотворения.

Некоторые из таких запасных мРНК кодируют белки, необходимые в ходе дробления, когда эмбрион в огромных масштабах строит хроматин, клеточные мембраны и компоненты цитоскелета. Такие материнские мРНК включают матрицу гистоновых белков, транскрипты для цитоскелетных белков активна и тубулина, и мРНК белков циклинов, которые синхронизируют первые клеточные деления (Raff et al., 1972; Rosenthal et al., 1980; Standart et al., 1986). О таких запасах мРНК и белков говорят как о **материнском вкладе** или **генах и белках материнского эффекта** (производных материнского генома); у многих видов (включая морских ежей и *Danio*) поддержание нормального темпа и характера первых клеточных делений не требует наличия ДНК или даже ядра! Вместо нее необходим непрерывный синтез белка с запасенных мРНК, полученных от матери (**рис. 3.21**; Wagenaar and Mazia, 1978; Dekens et al., 2003). Запасные мРНК кодируют также белки, определяющие путь развития клеток. К ним относятся матрицы *bicoid*, *caudal* и *nanos*, обеспечивающие эмбрион *Drosophila* информацией о том, где формировать голову, грудь и брюшко. Так что для каждого из нас наступает момент, когда нужно поблагодарить биологических мам за те транскрипты, которые они передали нам в самом начале (и всех мам за все, что они делают для нас по завершении оогенеза).

Регуляция трансляции в ооцитах имеет в основном негативный характер, поскольку для материнских мРНК «состояние по умолчанию» — это *доступность* для трансляции, но не активная транс-

¹ Интересно, что было открыто несколько альтернативных сплайс-изоформ мышинного HuD, которые демонстрируют дифференциальную экспрессию, дифференциальную внутриклеточную локализацию (посттрансляционный регуляторный механизм) и различные функциональные последствия для выживания и дифференцировки нейронов (Hayashi et al., 2015).

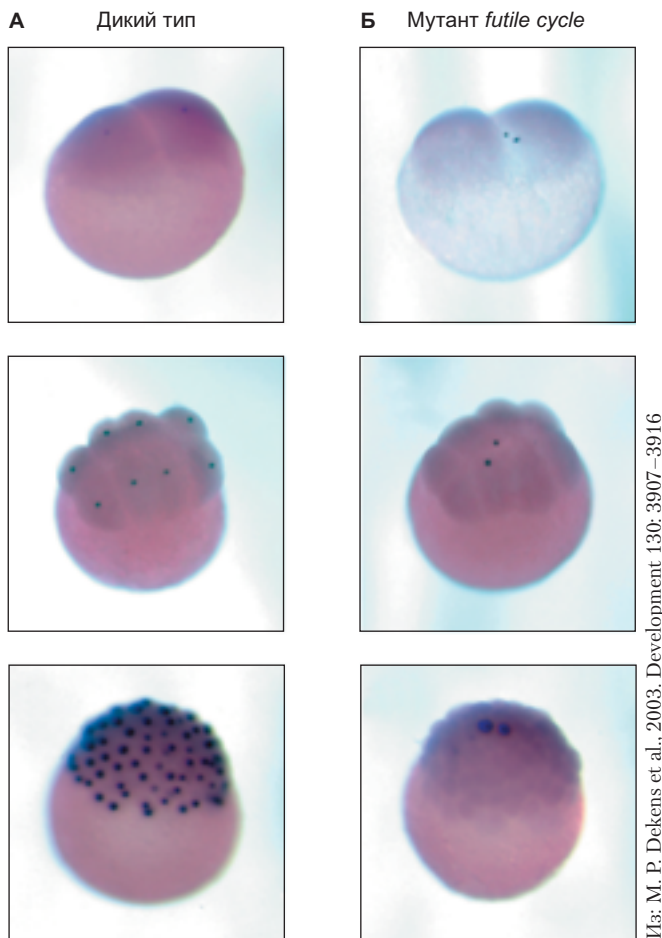


Рис. 3.21. Вклад материнских факторов в репликацию ДНК в бластуле *Danio*. **А.** Бластулы дикого типа с мечеными BrdU ядрами (синий) во всех клетках. **Б.** Хотя число клеток у мутантов *futile cycle* нормальное, в них всякий раз можно наблюдать только два меченых ядра, что свидетельствует о их неспособности завершить слияние пронуклеусов. Даже в отсутствие зиготической ДНК первые деления дробления проходят бесперебойно в силу вклада материнских факторов. Остановка развития у мутантов *futile cycle* происходит перед началом гаструляции

ляция. Соответственно, необходимы ингибиторы, препятствующие трансляции мРНК в ооците, причем они должны каким-либо образом быть удалены в нужное время после оплодотворения. Особенно важное значение для регуляции доступности мРНК для рибосом проявляют 5'-кэп и 3'-НТО. Если не образуется 5'-кэпа или в 3'-НТО отсутствует поли-А-хвост, матрица, скорее всего, не транслируется. Ооциты многих видов используют эти концы как средство управления трансляцией их мРНК. Например, в ооцитах табачного бражника часть мРНК образуется без метилированного 5'-кэпа. В таком состоянии эффективная трансляция невозможна. После оплодотворения, однако, образование кэпа завершает метилтрансфераза, и трансляция этих мРНК становится возможной (Kastern et al., 1982).

Избирательность рибосом: избирательная активация трансляции мРНК

Долгое время считалось, что рибосомы не проявляют избирательности в отношении тех или иных мРНК. В конце концов, эукариотические матрицы могут считать даже рибосомы *E. coli*, а рибосомы из незрелых красных кровяных клеток долгое время использовали для трансляции мРНК из любых источников. Однако накопленные данные показывают, что рибосомные белки не одинаковы во всех клетках и некоторые из них необходимы для трансляции определенных матриц. Когда Кондрашов с коллегами (2011) картировали ген, вызывающий многочисленные деформации скелета у мышей, они обнаружили, что мутация произошла не в одном из известных генов установления полярности скелета, а в гене рибосомного белка Rpl38. Рибосомы с таким мутантным белком по-прежнему могли транслировать большую часть матриц, но рибосомы в предшественниках клеток скелета не могли транслировать мРНК семейства Нох-генов. Транскрипционные факторы Нох (см. гл. 12 и 17) определяют тип позвонка на каждом конкретном уровне вдоль позвоночника (грудные позвонки с ребрами, брюшные позвонки без ребер и т. д.). В отсутствие функционального Rpl38 клетки позвонков оказываются неспособными сформировать комплекс инициации мРНК соответствующих Нох-генов, и скелет получается деформированным (рис. 3.22). Было показано, что мутации в других генах рибосомных белков тоже приводят к дефектным фенотипам (Terzian and Box, 2013; Watkins-Chow et al., 2013).

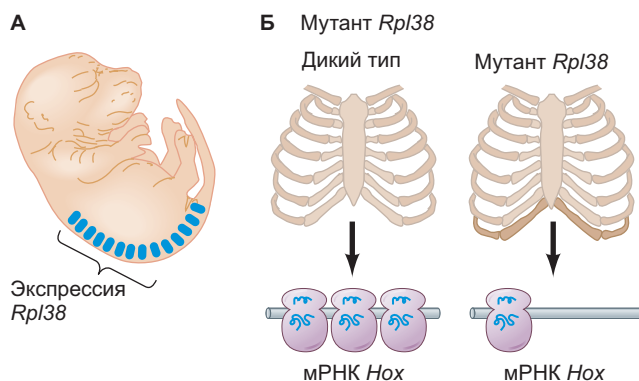


Рис. 3.22. Модель гетерогенности рибосом у мышей. **А.** В зависимости от тканевой локализации рибосомы содержат слегка различающиеся белки. Рибосомный белок Rpl38 (т. е. белок 38 большой субъединицы рибосомы) сконцентрирован в рибосомах, находящихся в сомитах, которые дают начало позвонкам. **Б.** Эмбрион дикого типа с нормальными позвонками и нормальной трансляцией гена *Нох* (слева). Мыши, у которых отсутствует Rpl38, имеют дополнительную пару позвонков, деформацию хвоста и сниженную трансляцию гена *Нох*. (По данным: N. Kondrashov et al., 2011. *Cell* 145: 383–397.)

МикроРНК: специфическая регуляция трансляции и транскрипции мРНК

Если белки могут связывать определенные последовательности нуклеиновых кислот, блокируя транскрипцию или трансляцию, можно предположить, что РНК справится с этой задачей еще лучше. В конце концов, можно сделать специфичную РНК, комплементарную определенной последовательности и связывающуюся с ней. И действительно, один из самых эффективных способов регуляции трансляции конкретной матрицы — это получение малых *антисмысловых* РНК, комплементарных участку данного транскрипта. Впервые антисмысловые РНК природного происхождения были обнаружены у круглого червя *C. elegans* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Было показано, что ген *lin-4* кодирует РНК из 21 нуклеотида, которая связывается с множеством сайтов 3'-НТО мРНК *lin-14* (рис. 3.23). Ген *lin-14* кодирует транскрипционный фактор LIN-14, который играет важную роль в период первой личиночной фазы развития *C. elegans*. Затем он становится не нужен и *C. elegans* способен ингибировать синтез *lin-14* с помощью антисмысловой РНК *lin-14*. Связывание транскриптов *lin-4* с 3'-НТО мРНК *lin-14* вызывает деградацию матрицы *lin-14* (Bagga et al., 2005).

РНК *lin-4* теперь считают «основательницей» обширной группы **микроРНК**. Анализ генома человека предсказывает наличие более 1000 локусов микроРНК, которые, вероятно, модулируют 50% белок-кодирующих генов в нашем организме (Berezikov and Plasterk, 2005; Friedman et al., 2009). Обычно микроРНК содержат всего 22 нуклеотида и образуются из более длинных предшественников. Последние могут находиться в независимых единицах транскрипции (ген *lin-4* расположен далеко от гена *lin-14*) или внутри собственных интронов регулируемого гена (Aravin et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2003).

Исходный РНК-транскрипт (он может содержать несколько повторов последовательности микроРНК) образует шпильки там, где РНК находит комплементарные участки в пределах собственной цепи. Поскольку короткие двухцепочечные молекулы РНК могут напоминать геномы патогенных вирусов, клетка обладает естественным механизмом, позволяющим распознавать такие структуры и использовать в качестве шаблона для их устранения (Wilson and Doudna, 2013). Интересно, что этот защитный механизм был приспособлен к использованию в качестве очередного способа дифференциальной регуляции экспрессии собственных генов клетки. Процесс, в котором микроРНК ингибируют экспрессию специфичных генов деградацией их мРНК, называют **РНК-интерференцией** (Guo and Kemphues, 1995; Sen and Blau, 2006; Wilson and Doudna, 2013), за описание которой Эндрю Файер и Крейг Мелло удостоены Нобелевской премии в 2006 г. (Fire et al., 1998).

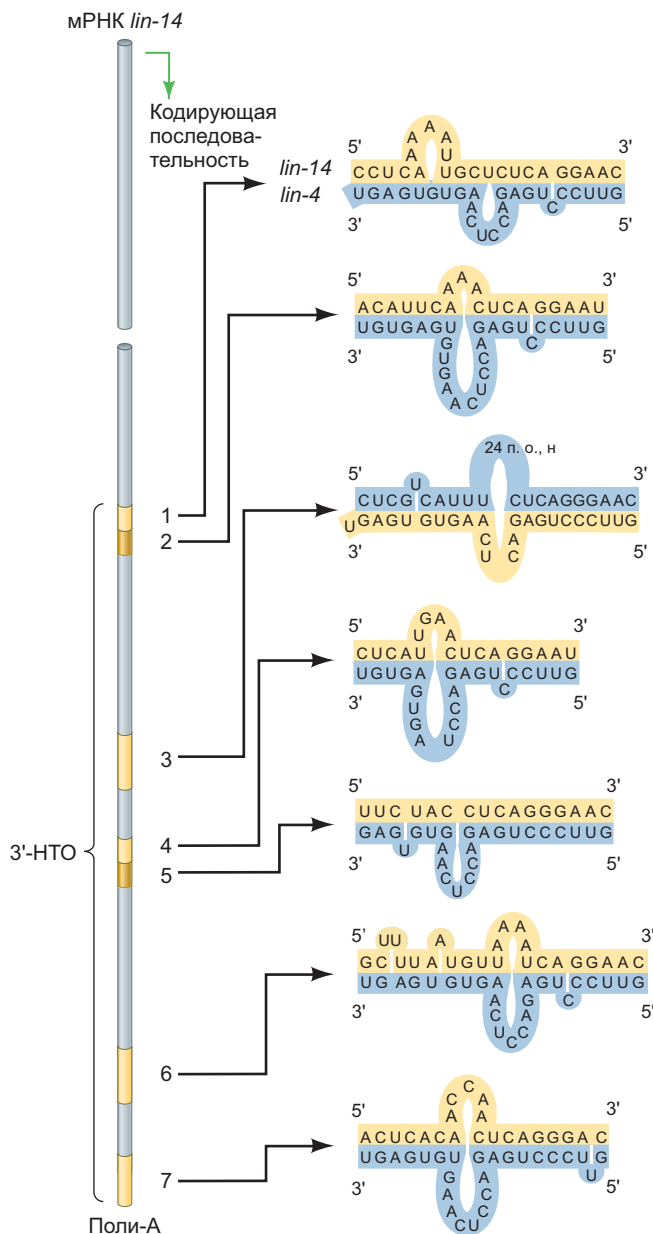


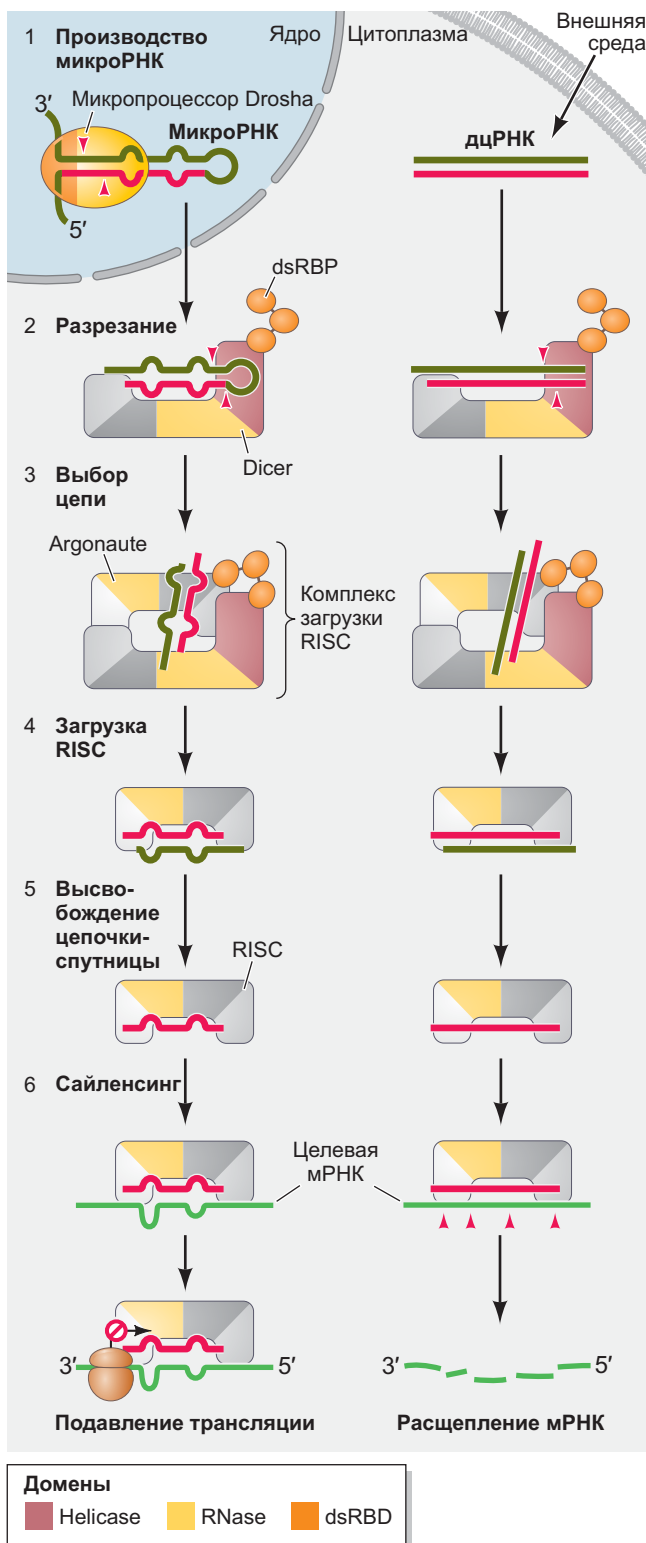
Рис. 3.23. Модель регуляции трансляции с мРНК *lin-14* с помощью РНК *lin-4*. Ген *lin-4* не производит мРНК. Вместо этого с него считываются малые РНК, комплементарные повторяющейся последовательности в 3'-НТО мРНК *lin-14*, которые связываются с ней, предотвращая ее трансляцию. (По данным: M. Wickens and K. Takayama, 1995. *Nature* 367: 17–18; B. Wightman et al., 1993. *Cell* 75: 855–862.)

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

МЕХАНИЗМ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Двухцепочечные структуры микроРНК, содержащие шпильки, обрабатывает набор РНКаз (Drosha и Dicer) с образованием одноцепочечных микроРНК (рис. 3.24). Затем микроРНК с рядом белков упаковываются в **РНК-индуцируемый комплекс выключения генов** (RNA-induced silencing

complex, RISC). Особенно важными членами этого комплекса являются белки семейства Argonaute. Малые регуляторные РНК способны связываться с 3'-НТО матричных и ингибировать их трансляцию. Связывание микроРНК и ассоциированных с ними комплексов RISC с 3'-НТО может регулировать трансляцию двумя путями (Filipowicz et al., 2008; see also Bartel, 2004; He and Hannon, 2004).



Во-первых, оно способно блокировать инициацию трансляции, что предотвращает связывание факторов инициации или рибосом. Например белки Argonaute могут напрямую связываться с метилированным гуанозином кэпа на 5'-конце мРНК (Djurancovic et al., 2010, 2011). Во-вторых, такое связывание может привлекать эндонуклеазы, которые расщепляют мРНК, обычно начиная с поли-А-хвоста (Guo et al., 2010). Второй способ, по-видимому, очень распространен в клетках.

МикроРНК И МАТЕРИНСКО-ЗИГОТИЧЕСКИЙ ПЕРЕХОД

МикроРНК могут быть использованы для «чистки» и настройки уровня генных продуктов. Мы уже упоминали материнские РНК в ооцитах, которые способствуют прохождению раннего развития. Как эмбрион избавляется от материнских РНК, когда использует их и начинает производить в своих клетках собственные мРНК? У Данио эта опера-

Рис. 3.24. Модель РНК-интерференции с двухцепочечной РНК (дцРНК) и микроРНК. Двухцепочечные киРНК (короткие интерферирующие РНК) или микроРНК, внесенные в клетку либо произведенные в ходе транскрипции и обработанные микропроцессорным комплексом с РНКазой Drosha, далее взаимодействуют с РНК-индуцируемым комплексом выключения генов (RNA-induced silencing complex, RISC), состоящим в первую очередь из белков Dicer и Argonaute, который готовит РНК к использованию в качестве указания цели для механизмов интерференции. (1) Говоря конкретнее, в ходе транскрипции киРНК или микроРНК образуется несколько областей шпильки, в которых РНК находит для спаривания близлежащие комплементарные участки. Первичная микроРНК расщепляется на отдельные шпильки РНКазой Drosha (так же как и киРНК), после чего экспортируется из ядра. (2)–(4) Оказавшись в цитоплазме, такие дцРНК распознаются и связываются в комплекс RISC белком Argonaute и РНКазой Dicer. (5) Dicer действует так же, как хеликаза, расплетая нити дцРНК. (6) Одна цепь (вероятно, та, на которой располагается Dicer) используется, чтобы связывать 3'-НТО целевых молекул мРНК для блокирования трансляции или запуска расщепления целевого транскрипта, что зависит (по крайней мере, отчасти) от силы комплементарного взаимодействия между микроРНК и ее мишенью. Для киРНК более характерно направление транскриптов на деградацию. Аббревиатуры dsRBD и dsRBP обозначают соответственно РНК-связывающий домен и белок (RNA binding domain/protein). Серым выделены другие домены Dicer и Argonaut. (По данным: L. He and G.J. Hannon, 2004. *Nat Rev Genet* 5: 522–531; R.C. Wilson and J.A. Doudna, 2013. *Annu Rev Biophys* 42: 217–239.)

ция по зачистке поручается таким микроРНК как *miR430*. Он один из первых генов транскрибируется в клетках эмбриона рыбы, и в геноме *Danio* около 90 его копий. Следовательно, уровень *miR430* возрастает весьма стремительно. У этой молекулы сотни мишеней (примерно 40% материнских РНК); она связывается с их 3' — НТО, после чего они теряют поли-А-хвосты и подвергаются деградации (рис. 3.25; Giraldez et al., 2006; Giraldez, 2010). Кроме того, перед тем как направить мРНК на деградацию, *miR430* подавляет инициацию трансляции (Bazzini et al., 2012).

Контроль экспрессии РНК за счет локализации в цитоплазме

Регулируется не только время трансляции мРНК, но и место экспрессии РНК. Подавляющее большинство мРНК (около 70% в эмбрионах *Drosophila*) локализовано в определенных местах клетки (Lécuyer et al., 2007). Как и избирательное подавление трансляции мРНК, избирательная локализация матриц часто осуществляется с использованием их 3'-НТО. Существует три основных механизма локализации мРНК (Palacios, 2007):

1. **Диффузия и локальное закрепление.** Такие мРНК, как *nanos*, свободно диффундируют в цитоплазме. Однако, попадая в задний полюс ооцита *Drosophila* в ходе диффузии, они закрепляются там белками, находящимися в этой конкретной области (рис. 3.26А).
2. **Локализованная защита.** мРНК вроде тех, что кодируют белок теплового шока *Drosophila* Hsp83,

свободно плавают в цитоплазме, но, как и мРНК *nanos*, мРНК *hsp83* аккумулируется на заднем полюсе. Однако в противоположность ситуации с мРНК *nanos*, мРНК *hsp83* подвергается деградации везде, кроме заднего полюса, где локализованные на ней белки защищают мРНК *hsp83* от разрушения (рис. 3.26Б).

3. **Активный транспорт по цитоскелету.** Активный транспорт, пожалуй, наиболее широко используемый механизм локализации мРНК. В данном случае 3'-НТО мРНК распознается белками, которые связывают эти матрицы с «моторными белками»,двигающимися вдоль цитоскелета к месту назначения (рис. 3.26 В). В гл. 9 мы увидим, что этот механизм очень важен для локализации мРНК транскрипционных факторов в разных областях ооцита *Drosophila*.

Механизмы дифференциальной экспрессии генов: посттрансляционные модификации белка

На синтезе белка история не заканчивается. Произведенный белок становится частью более крупного уровня организации. Он может войти в состав, например, структурных элементов клетки или участвовать в одном из множества ферментативных путей синтеза или распада клеточных метаболитов. В любом случае отдельный белок становится частью сложной «экосистемы», которая интегрирует его в сеть

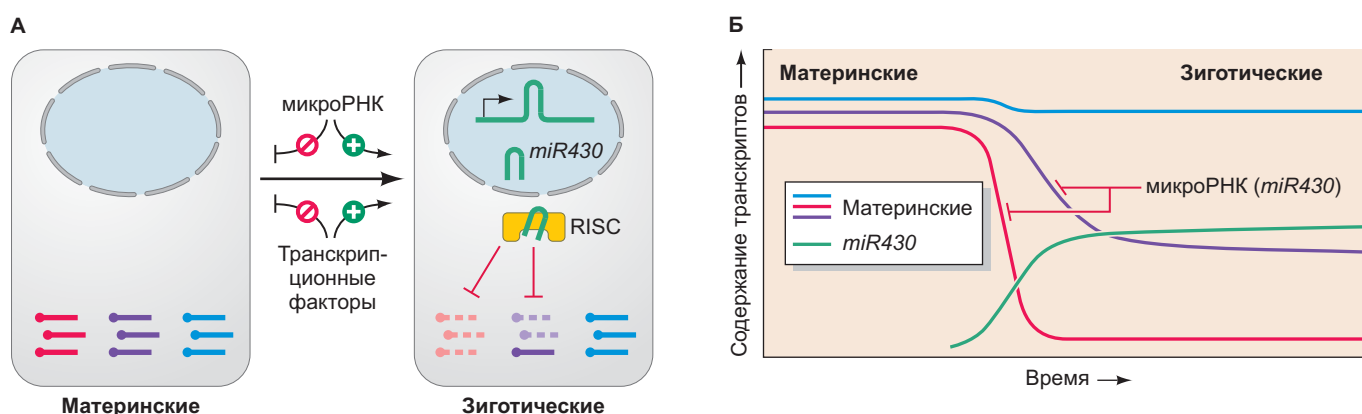


Рис. 3.25. Роль *miR430* в ходе материнско-зиготического перехода у *Danio*. **А.** Многочисленные мРНК материнского эффекта управляют развитием на стадии дробления, но переход к гастрляции требует активизации транскрипции зиготического генома. В ходе перехода микроРНК играют ведущую роль в удалении транскриптов, полученных от матери. **Б.** Было обнаружено, что *miR430* играет ведущую роль в интерференции в отношении большинства материнских транскриптов в бластуле *Danio* в момент ее перехода к зиготическому контролю в ходе гастрляции. На графике разными кривыми обозначено уменьшение содержания трех конкретных транскриптов, два из которых (фиолетовый и красный) подвергаются дифференциальной деградации с участием *miR430* (зеленый). (По данным: A. J. Giraldez, 2010. *Curr Opin Genet Dev* 20: 369–375.)

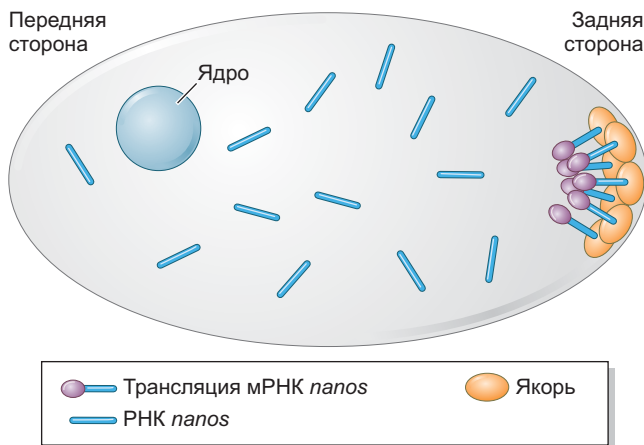
взаимосвязей с множеством других белков. Он еще может пройти несколько изменений, определяющих, будет ли белок активен, и если да, то как он будет функционировать.

Некоторые только что синтезированные белки остаются неактивными до тех пор, пока от них не будут удалены определенные ингибирующие участки. Именно это происходит при образовании инсулина из его более крупного белкового предшественника. Некоторые белки для работы должны быть снабжены «адресом» их специфического места назначения в клетке. Белки часто изолируются в определенных областях клетки, будь то мембрана, лизосомы, ядро или митохондрии. Часть белков должна собираться с другими в функциональную единицу. Примерами объединения множества белков в функциональные единицы служат гемоглобин, микротрубочки и рибосомы. К тому же, некоторые белки неактивны, пока не свяжут ион (например, Ca^{2+}) или не будут модифицированы путем ковалентного присоединения фосфатной или ацетатной группы. Необходимость такого типа модификации станет очевидной в гл. 4,

поскольку многие из важнейших белков в эмбриональных клетках не функционируют, пока их не активирует некий сигнал.

Наконец, даже если белок активно транслируется и готов к работе, клетка может немедленно направлять его в комплекс деградации, называемый протеасомой. Зачем клетке тратить энергию на синтез белка, чтобы сразу деградировать его? Если белок был нужен ей для быстрого ответа в определенный момент времени, расход энергии может того стоить. К примеру, нейрон вытягивает длинный аксонный отросток в поисках мишени для синапса в ходе процесса, называемого наведением аксонов (см. гл. 15). Такие ищущие нейроны синтезируют определенные рецепторные белки, только лишь для того чтобы немедленно отправить их на деградацию — до тех пор, пока клетка не достигнет среды, в которой требуется решение по выбору направления. Сигналы в таком месте заставляют клетку приостановить деградацию рецепторов, что позволяет им транспортироваться в мембрану и немедленно функционировать, указывая аксону направление к его мишени.

А Диффузия и локальное закрепление



Б Локализованная защита

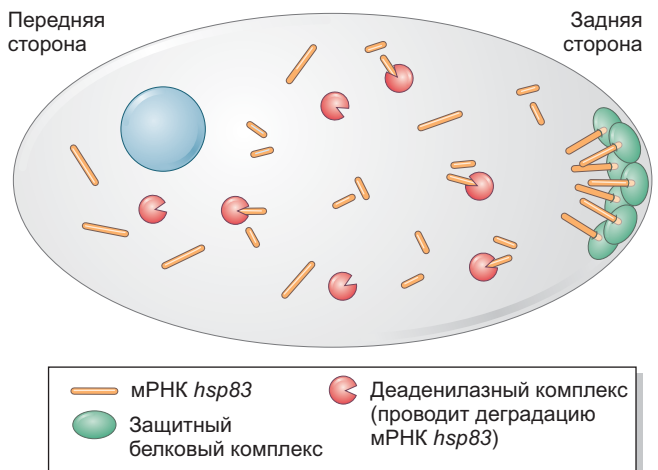
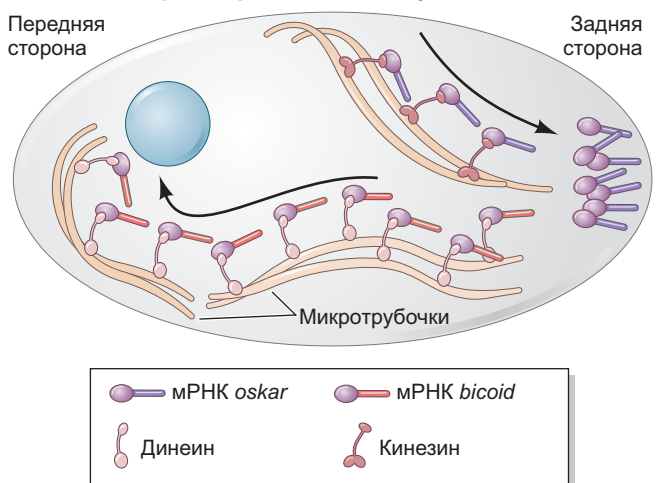


Рис. 3.26. Локализация мРНК. **А.** Диффузия и локальное закрепление. мРНК *nanos* диффундирует по яйцу *Drosophila* и связывается (отчасти с помощью белка Oskar) в задней части ооцита. Это закрепление позволяет мРНК *nanos* транслироваться. **Б.** Локализованная защита. мРНК белка теплового шока *Drosophila* (*Hsp83*) подвергается деградации, если не окажется связанной с защитным белком (в данном случае тоже на задней стороне ооцита). **В.** Активный транспорт по цитоскелету, приводящий к аккумуляции мРНК на определенной стороне. В данном случае мРНК *bicoid* транспортируется вдоль микротрубочек моторным белком динеином в переднюю часть ооцита. В то же время мРНК *oskar* переносится по микротрубочкам в заднюю часть ооцита моторным белком кинезином. (По данным: I.M. Palacios, 2007. *Semin Cell Dev Biol* 18: 163–170.)

В Активный транспорт по цитоскелету



РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Основные инструменты генетики развития

Распутывание генетических механизмов развития, описанных в этой книге, зависит от хитроумного набора основных инструментов — методов определения конкретного времени и места экспрессии гена, или расположения определенной мРНК, или местонахождения белка в клетке. Знание этих методов и принципов их работы значительно углубит ваше понимание генетики развития и биологии в целом. К способам детекции транскриптов относят Нозерн-блоты, ПЦР-РВ, гибридизацию *in situ*, микрочипы и технологии секвенирования нового поколения, в то время как Вестерн-блоты и иммуногистохимические методы позволяют детектировать белки. Чтобы установить функции генов после локализации их продуктов, ученые используют такие новые технологии, как CRISPR/Cas9-опосредованный нокаут, антисмысловые методы, РНК-интерференцию, морфолины (нокдаун), GAL4/UAS и Cre-lox-системы. Для идентификации белков, связывающихся с определенными последовательностями ДНК, используют методы ChIP-Seq и CUT&RUN. Помимо этого, «высокопроиз-

водительные» методы анализа РНК и RNA-Seq, а также полногеномное секвенирование позволили исследователям сравнивать тысячи мРНК, что совместно с компьютерными синтетическими методами позволяет предсказывать взаимодействия между белками и мРНК. Описание большинства этих процедур можно найти на oup.com/he/barresi12xe. В дополнение к этому ниже представлены описания некоторых техник, имеющих наибольшее значение для сегодняшних экспериментальных методов. Приятной работы с этими инструментами!

Характеристика экспрессии генов

ГИБРИДИЗАЦИЯ *in situ*

При гибридизации *in situ* на тотальных препаратах целый эмбрион (или его часть) может быть окрашен на определенные мРНК. Основной принцип заключается в том, чтобы воспользоваться одноцепочечным характером мРНК и внести комплементарную целевой мРНК последовательность с возможностью визуализации. В этой технологии окрашивание позволяет исследователям изучать целые эмбрионы (или их органы), не препарировав их, и за счет этого — крупные области экспрессии генов рядом с областями, где она отсутствует. На **рис. 3.27А** показана гибридизация *in situ*,

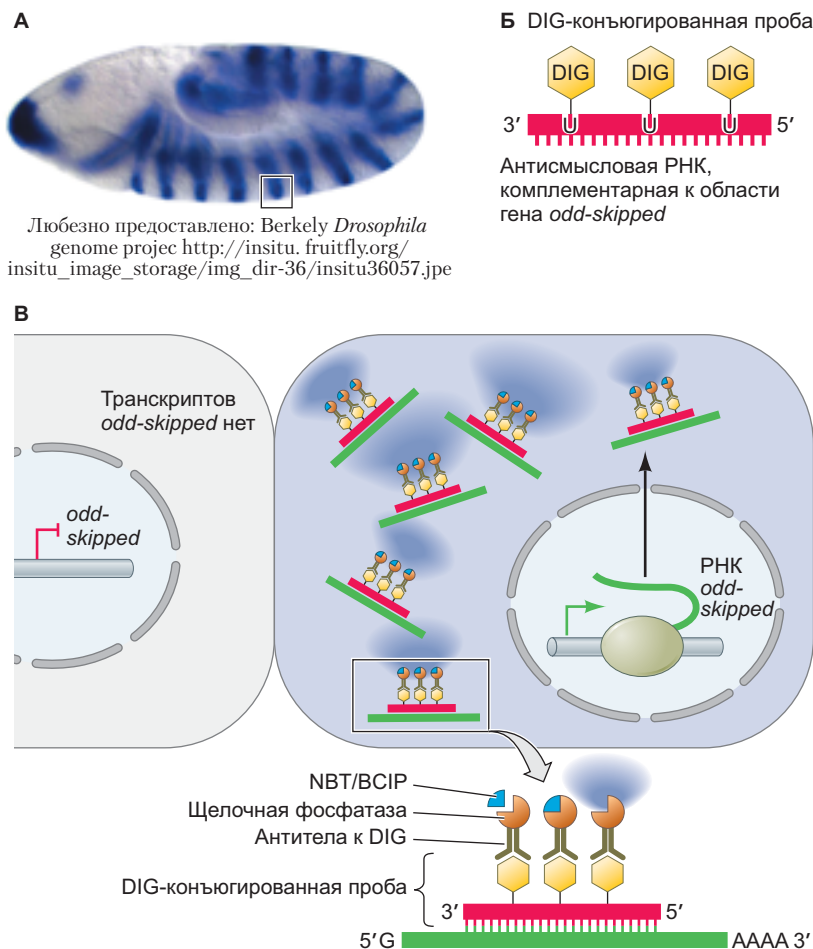


Рис. 3.27. Гибридизация *in situ*. **А.** Гибридизация *in situ* к мРНК *odd-skipped* (синий) на тотальном препарате эмбриона *Drosophila* на стадии 9. **Б.** Антисмысловая РНК, уридиновые нуклеотиды в которой конъюгированы с дигоксигенином (DIG). **В.** Изображение двух клеток на границе области экспрессии *odd-skipped*, показанной в рамке на (А). Клетка слева не экспрессирует *odd-skipped*, в то время как клетка справа экспрессирует. Антисмысловая DIG-меченая РНК-проба, комплементарная гену *odd-skipped*, гибридизуется в любой клетке, в которой есть транскрипты *odd-skipped*. После гибридизации пробы образцы обрабатывают антителами к DIG, конъюгированными с ферментом щелочной фосфатазой. При добавлении к образцу нитро-голубого тетразолия (NBT) и 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата (BCIP) щелочная фосфатаза преобразует их в синий осадок. Синими становятся только те клетки, в которых экспрессируется *odd-skipped*

направленная на мРНК гена *odd-skipped*, на материале фиксированного интактного эмбриона *Drosophila*. Вначале необходимо создать пробу для детекции мРНК (пробу *in situ*). Проба представляет собой антисмысловую молекулу РНК длиной около 200–2000 нуклеотидов, уридиновые нуклеотиды в составе которой конъюгированы с дигоксигенином (рис. 3.27Б). Дигоксигенин — это вещество, производимое определенной группой растений и не обнаруженное в клетках животных, т. е. отличное от любых других молекул животной клетки. В ходе процедуры эмбрион проходит пермеабиллизацию растворителями липидов и протеиназами, чтобы проба могла проходить в клетки и из клеток. Поступая в клетку, антисмысловая РНК гибридизуется с целевой мРНК. Чтобы визуализировать клетки, в которых произошла гибридизация, исследователи добавляют антитела, распознающие дигоксигенин. Антитела, в свою очередь, искусственно конъюгированы с ферментом типа щелочной фосфатазы. После инкубации с антителами и многократных отмывок для удаления всех несвязанных антител эмбрион погружают в раствор, содержащий субстрат, который преобразуется ферментом в окрашенный продукт. Активный фермент должен присутствовать только там, где имеется дигоксигенин (на предыдущих этапах все эндогенные ферменты клетки были инактивированы), а дигоксигенин может присутствовать только там, где обнаруживается специфичная комплементарная пробе мРНК. Таким образом, на рис. 3.27В темно-синее окрашивание, вызванное ферментом, указывает на присутствие целевой мРНК.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ С ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЕЙ ХРОМАТИНА

На протяжении XX в. мы обнаружили актеров в драме транскрипции генов, но лишь с началом XXI в. смогли заглянуть в их сценарий. Как обнаружить участок гена, с которым связывается определенный транскрипционный фактор или на котором локализованы нуклеосомы с определенными модификациями? Приобретенная недавно возможность идентифицировать специфичные к конкретным белкам сайты связывания на ДНК, используя секвенирование с иммунопреципитацией хроматина (ChIP-Seq) или еще более недавней разновидности ChIP-Seq под названием CUT&RUN, показала, что существуют различные типы промоторов, использующие различные «сценарии» транскрипции генов (Johnson et al., 2007; Jothi et al., 2008; Skene and Henikoff, 2017). Метод ChIP-Seq основан на двух высокоспецифичных взаимодействиях. Одно из них — это связывание транскрипционного фактора или модифицированной

нуклеосомы с определенными последовательностями ДНК (такими как энхансерные элементы), а второе — связывание молекул антител с изучаемым транскрипционным фактором или модифицированным гистоном (рис. 3.28; Liu et al., 2010).

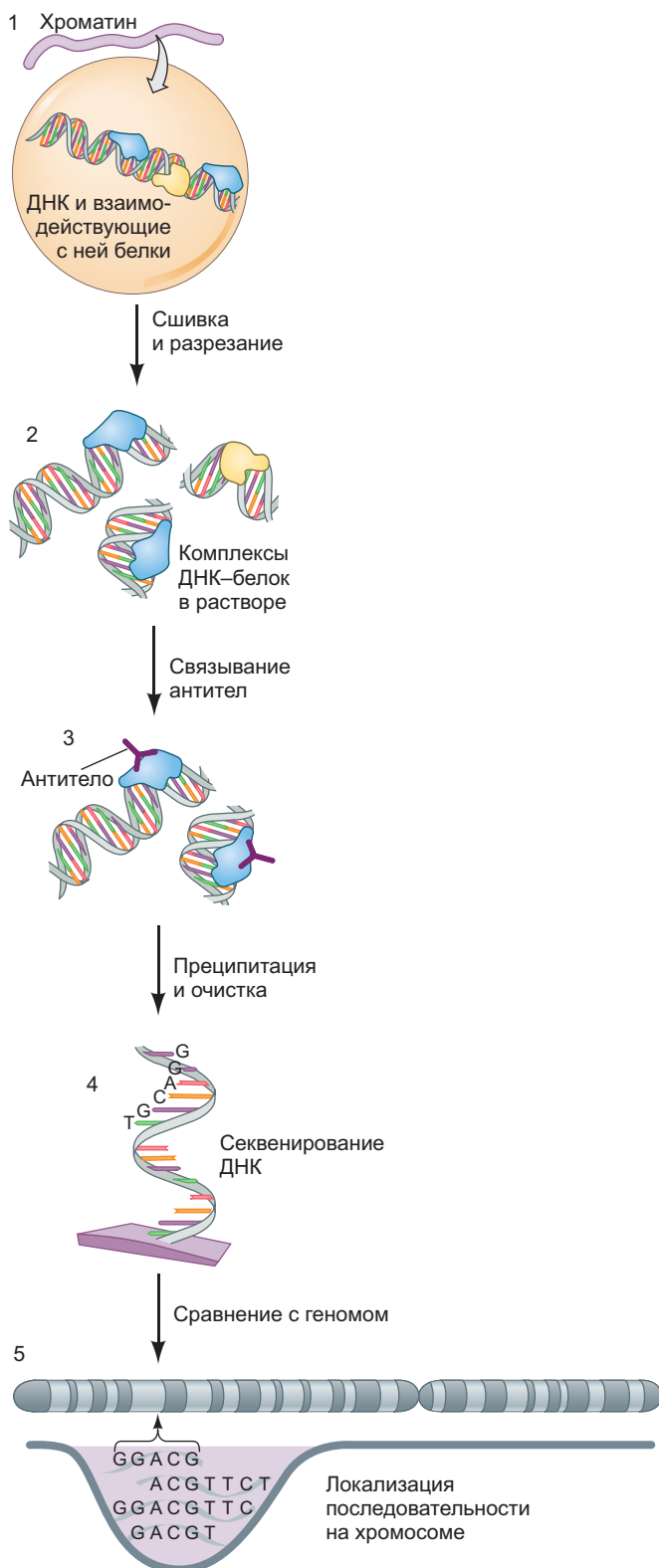
На первом этапе ChIP-Seq хроматин изолируют, а белки пришивают к ДНК, с которой они связаны (обычно с помощью глутарового альдегида или формальдегида). Этот процесс предотвращает диссоциацию нуклеосом или транскрипционных факторов с ДНК. После сшивки комплекс ДНК с белками фрагментируют (обычно с помощью ультразвука, но иногда ферментативно) на кусочки длиной около 500 нуклеотидов. Следующим шагом связывают белок интереса с антителом, распознающим только этот конкретный белок. Антитела можно осадить из раствора (часто это делают с помощью магнитных бусин, пришитых к антителам), что потянет за собой на дно пробирки и любые фрагменты ДНК, связанные с белком интереса. После отделения фрагментов ДНК от белка их амплифицируют, секвенируют и картируют на полный геном. Таким способом можно точно идентифицировать последовательности ДНК, специфично связанные определенным транскрипционным фактором или нуклеосомами, содержащими модифицированные гистоны.

Недавно была разработана более эффективная и чувствительная версия метода ChIP-Seq, названная CUT&RUN (cleavage under targets and release using nuclease — расщепление под мишенями и высвобождение с использованием нуклеаз; Skene and Henikoff, 2017). CUT&RUN отличается от традиционного ChIP-Seq: без фрагментации и растворения хроматина можно получить значительно более высокое разрешение и количественную оценку картированных последовательностей. Как вы увидите далее, с использованием ChIP-Seq или CUT&RUN исследователи идентифицируют важные энхансерные области, контролирующие как ключевые, так и тонкие изменения в ходе эмбрионального развития. Такие недавно идентифицированные энхансеры оказались чрезвычайно полезными для создания трансгенных репортерных конструкторов, которые позволили нам визуализировать экспрессию генов в живых клетках и организмах.

ГЛУБОКОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ: RNA-SEQ

Как подчеркивалось в этой главе, именно полный репертуар генов, экспрессирующихся в клетке, определяет генно-регуляторную сеть, контролирующую клеточную идентичность. Значительные усовершенствования технологии секвенирования позволили секвенировать полные геномы, но геном клетки не равен ее транскриптому (совокупности

экспрессирующихся РНК). Чтобы приблизиться к идентификации всех транскриптов, присутствующих в данном эмбрионе, ткани или даже отдельной клетке, был разработан метод **RNA-Seq**. RNA-Seq использует преимущества высокопроизводительной технологии секвенирования нового поколения для секвенирования и количественной



оценки всех РНК, присутствующих в клетке (**рис. 3.29**). Если говорить подробнее, РНК при этом изолируют из образцов и конвертируют в комплементарную ДНК (кДНК) по стандартной технологии с использованием *обратной транскриптазы*. кДНК расщепляют на небольшие фрагменты, к концам которых добавляют известные адаптерные последовательности. Адаптеры позволяют обеспечить иммобилизацию и ПЦР-амплификацию этих транскриптов. Секвенирование нового поколения может анализировать эти транскрипты как нуклеотидные последовательности количественно (Goldman and Domschke, 2014). Мощность метода RNA-Seq особенно заметна при сравнении идентичных образцов, различающихся только избранными экспериментальными параметрами. Можно задаться вопросом: «Каковы различия в наборах транскриптов в тканях, расположенных в разных областях эмбриона, или в одной и той же ткани в конкретные сроки развития, или же в тканях, обработанных определенным веществом, по сравнению с интактными?» Появление флуоресцентного сортирования клеток (FACS, fluorescence activated cell sorting) и микродиссекции позволило точно изолировать ткани и отдельные клетки, а последние улучшения чувствительности RNA-Seq привели к появлению *транскриптомики* — науки о транскриптомах отдельных клеток.

Общепринятый экспериментальный подход состоит в том, что сначала планируют целевой эксперимент по глубокому секвенированию, позволяющий сформировать список генов, ассоциированных с данным состоянием. Исследователи выбирают из списка гены-кандидаты для проверки их функций в изучаемой системе, используя биоинформатику и свое понимание биологии развития.

Проверка функции генов

Биологи развития использовали целый спектр методов, чтобы вызвать мутации в генах для определения их функций. Эти методы можно разбить

Рис. 3.28. Секвенирование с иммунопреципитацией хроматина (ChIP-Seq). Хроматин изолируют из ядра клетки. Белки хроматина сшивают с сайтами их посадки на ДНК, а ДНК с пришитыми к ней белками фрагментируют на небольшие кусочки. Антитела, специфично связывающиеся с белками хроматина, осаждают из раствора вместе с теми молекулами, которые они связали. Фрагменты ДНК, ассоциированные с осажденными комплексами, очищают от белков и секвенируют. Эти последовательности можно сравнивать с картами генома для обнаружения точного местоположения генов, которые регулируют изучаемые белки. (По данным: A. M. Szalkowski and C. D. Schmid, 2011. *Brief Bioinform* 12: 626–633 и Chris Taplin/CC BY-SA 2.0.)

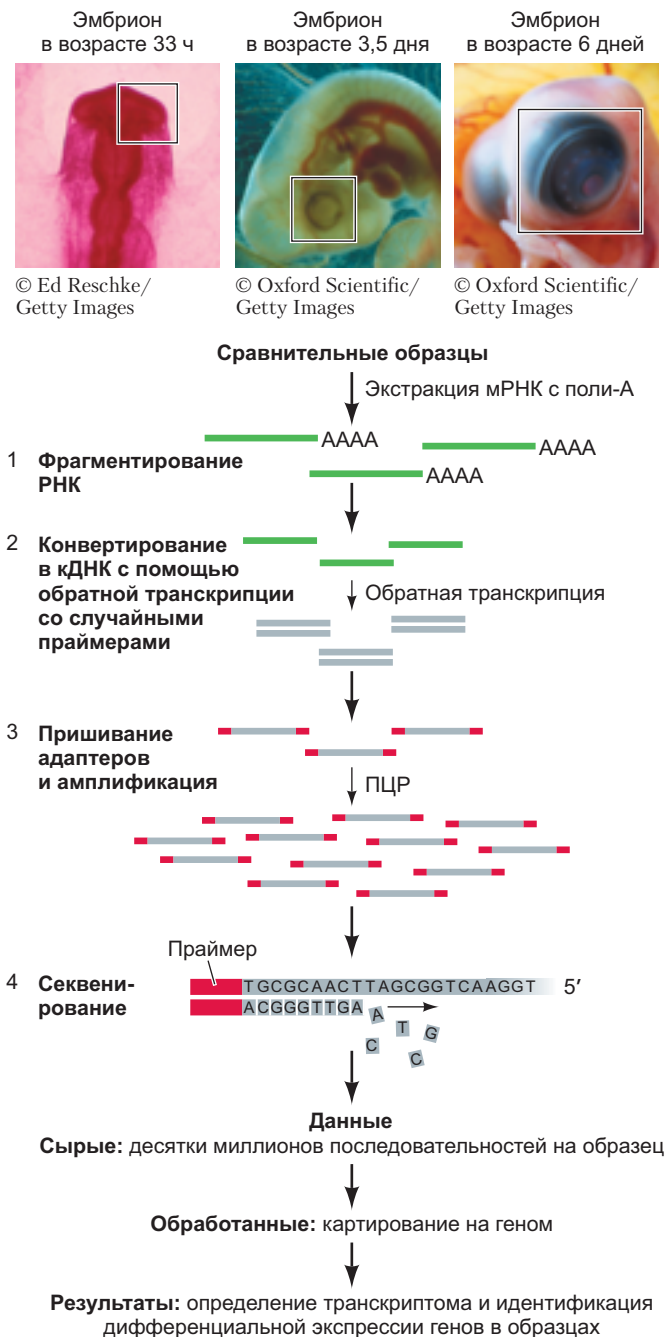


Рис. 3.29. Глубокое секвенирование: RNA-Seq. *Сверху:* исследователи начинают с конкретных видов тканей, как правило, сравниваемых в разных условиях, например эмбрионов на разных стадиях (здесь показаны куриные эмбрионы), изолированных тканей (например, глаз, выделенных рамками) или даже отдельных клеток и образцов с разными генотипами или подвергнутых различным экспериментальным манипуляциям. (1) РНК изолируют, чтобы получить только те гены, которые активно экспрессируются. (2) Транскрипты затем фрагментируют на более мелкие кусочки и используют для создания кДНК с помощью обратной транскриптазы. (3) К концам кДНК пришивают специальные адаптеры, позволяющие завершить амплификацию в ПЦР и иммобилизацию для (4) последующего секвенирования. (По данным: J.H. Malone and B. Oliver, 2011. *BMC Biol* 9: 34.)

на две категории: прямую генетику и обратную генетику. В случае **прямой генетики** организм подвергают действию агента, который вызывает нецелевые, случайные мутации, а среди полученных фенотипов проводят скрининг на мутации, затронувшие развитие. Отдельные мутации можно вызывать в гомозиготах или в гетерозиготах, если они серьезно влияют на выживаемость. Где конкретно произошла мутация, обычно становится известно только после фенотипического анализа. Два важных скрининга методом прямой генетики были проведены на *Drosophila* и *Danio* Кристианой Нюсслейн-Фольхард и ее коллегами (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Их исследования внесли огромный вклад в идентификацию и функциональную характеристику многих генов и сигнальных путей, которые сегодня известны нам как значимые для развития и патологии.

В случае **обратной генетики** исследователи начинают работу с выбора гена, которым они хотят манипулировать, и затем производят либо его нокаут, либо нокдаун его экспрессии. Используя RNAi (РНК-интерференцию, в ходе которой малые РНК связывают РНК-мишени) или морфолины (аналоги нуклеотидов, которые блокируют сайты старта транскрипции или сайты сплайсинга РНК-мишеней), можно, соответственно, направить транскрипт определенного гена на деградацию или блокировать его сплайсинг либо трансляцию (см. рис. 3.24). Эти методы ингибируют работу генов, но не всегда полностью и только на ограниченный период времени, поскольку и двухцепочечные РНК (дцРНК), созданные в процессе РНК-интерференции, и морфолины подвергаются разведению и деградации в ходе развития (следовательно, происходит нокдаун гена вместо нокаута). Исследователи могут воспользоваться этой особенностью и использовать разные количества дцРНК или морфолинов, чтобы добиться дозозависимого эффекта.

Напротив, целенаправленные нокауты генов отличаются тем, что полностью исключают функцию генов-мишеней. Такая элиминация была эффективно проведена на мышах, у которых исследователи использовали эмбриональные стволовые клетки для встраивания ДНК-конструкта, называемого *неомициновой кассетой*, в конкретный ген в процессе гомологичной рекомбинации. Такая вставка одновременно вносит мутацию в ген и, кодируя антибиотик неомицин, обеспечивает механизм отбора для идентификации мутировавших клеток. Эти клетки вводят в бластоцисты, из бластоцист развиваются химерные мыши, у которых только некоторые клетки несут мутацию. Таких мышей скрещивают для получения гомозиготных

мутантных мышей с полной утратой функции гена-мишени¹.

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА МЕТОДОМ CRISPR/CAS9

Метод редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas9 оказал огромное влияние на генетические исследования, сделав изменение генов более быстрым и доступным, чем когда-либо, и при этом относительно простым у разных организмов, от *E. coli* до приматов (Jansen et al., 2002). Метод основан на системе, которая встречается в природе у прокариот и защищает их от вторжения вирусов (Barrangou et al. 2007). У прокариот CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats — короткие палиндромные кластерные повторы) — это участки ДНК, содержащие короткие отрезки, которые, будучи транскрибированы в РНК, служат шаблоном, или «гидом» (гид-РНК, gRNA), для распознавания вирусной ДНК. РНК связывается также с эндонуклеазой, названной Cas9 (CRISPR associated enzyme 9 — связанный с CRISPR фермент 9). При связывании гид-РНК с вирусной ДНК пришедшая с первой Cas9 катализирует образование двухцепочечных разрывов в чужеродной ДНК, обезвреживая вирус.

В 2012 г. исследователи показали эффективное применение гид-РНК и Cas9 для внесения мутаций в гены эукариот (Jinek et al., 2012). Когда в клетку вводят гид-РНК CRISPR, специфические к некоторому гену, вместе с Cas9, гид-РНК направляет белок Cas9 к гену интереса, что приводит к образованию в его цепи ДНК двухцепочечных разрывов (рис. 3.30). Клетки естественным образом пытаются репарировать двухцепочечные разрывы в ходе процесса, называемого негомолотическим соединением концов (non-homologous end joining, NHEJ). Однако репарация путем NHEJ зачастую несовершенна и приводит к образованию **инделов** (инсерций и делеций нуклеотидов в ДНК). Вне зависимости от того, представлен индел инсерцией или делецией, существует значительная вероятность, что он приведет к сдвигу рамки считывания гена и соответственно создаст преждевременный стоп-кодон где-то после мутации, что приведет к утрате функции гена.

Систему CRISPR/Cas9 успешно применили на широком спектре видов, включая *Drosophila*, *Danio* и мышей, с частотой некоторых мутаций, превышающей 80% (Bassett et al., 2013). Исследователям удалось добиться от CRISPR еще большего,

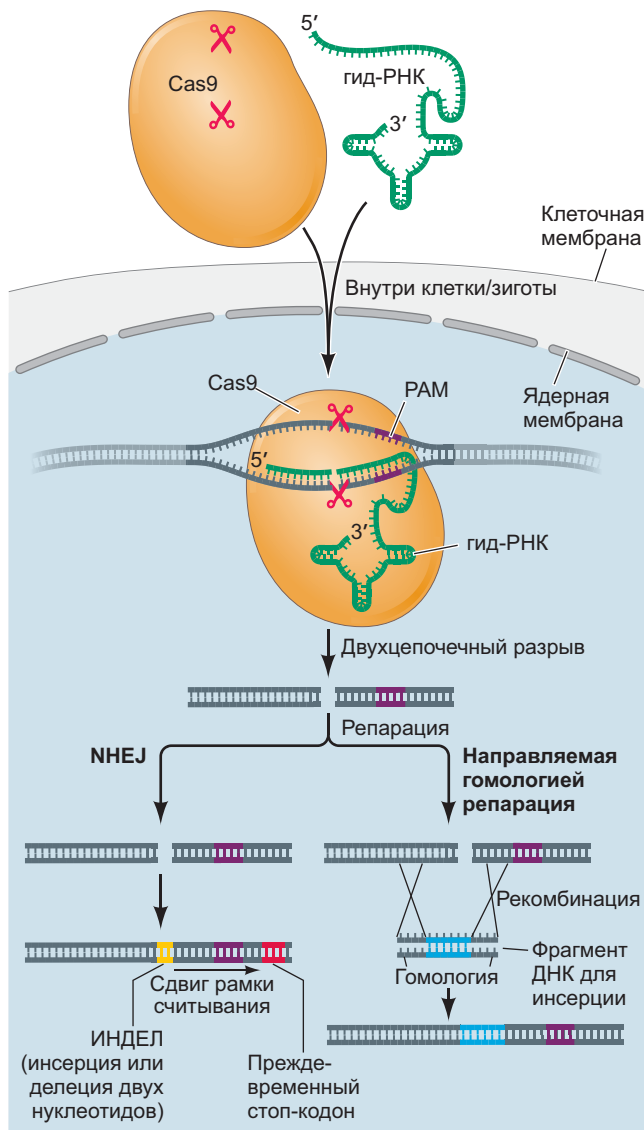


Рис. 3.30. CRISPR/Cas9-опосредованное редактирование генома. Систему CRISPR/Cas9 используют с целью образования инделов или инсерционного мутагена в гене интереса. В клетки вносят сконструированную специально для этого гена гид-РНК вместе с нуклеазой Cas9, например путем коинъекции в зиготу вскоре после оплодотворения. Гид-РНК связывается с комплементарным участком генома и привлекает в эту область Cas9, которая производит двухцепочечные разрывы. Негомолотическое соединение концов (*non-homologous end joining*, NHEJ) — это клеточный механизм репарации ДНК, который часто приводит к образованию небольших инсерций или делеций (длиной около 2–30 пн; здесь показана инсерция двух нуклеотидных пар), которые могут вызвать появление преждевременного стоп-кодона и потенциальную утрату функции белка. Кроме того, для инсерции известных последовательностей в месте двухцепочечного разрыва используют плазмиды, несущие вставки с гомологией к участкам, окружающим области-мишени гид-РНК. В настоящее время ученые изучают возможность использования этих методов для исправления мутаций. PAM (*protospacer adjacent motif*) — мотив, прилегающий к протоспейсеру

¹ Дополнительную информацию об этих и других методах утраты функции генов можно получить на сайте our.com/he/barresi12xe.

используя несколько гид-РНК, направленных одновременно на несколько генов, что приводит к образованию двойных и тройных нокауты. Важно, что эта система может быть использована для точного прицельного редактирования генома за счет включения коротких фрагментов ДНК, служащих шаблонами для репарации. Эти участки ДНК синтезируются таким образом, чтобы их последовательности у 5'- и 3'-концов имели гомологию с последовательностью нуклеотидов в месте двухцепочечного разрыва, стимулируя гомологичную рекомбинацию (см. рис. 3.30). Этот процесс *направляемой гомологией репарации* (homology directed repair) в настоящее время тестируют на способность восстанавливать локусы с известными мутациями человека; он обладает потенциалом для лечения ряда генетических заболеваний, таких как мышечные дистрофии (Nelson et al., 2016). CRISPR/Cas9 быстро показал себя как удивительно универсальный метод редактирования генома самых разных видов, позволяющий достигать как исследовательских, так и терапевтических целей. Одно из первейших преимуществ CRISPR/Cas9 в том, что он, по-видимому, успешно работает во всех организмах. Такая универсальность может дать начало новой эре функционального анализа генов у видов, применение к которым генетических методов до этого представляло собой непреодолимое препятствие.

GAL4-UAS-СИСТЕМА

Одними из наиболее впечатляющих примеров использования этой генной технологии были тканеспецифичные активация и угнетение таких регуляторных генов, как *Pax6*. Так, Гальдер с коллегами, работая на эмбрионах *Drosophila* (Halder et al., 1995), разместили ген, кодирующий транскрипционный активатор дрожжей белок GAL4 после энхансера, известного функционированием в губных имажинальных дисках (тех частях личинки *Drosophila*, которые становятся ротовым аппаратом взрослой особи). Другими словами, ген транскрипционного фактора GAL4 разместили рядом с энхансером генов, которые в норме экспрессируются в развивающихся частях рта. Таким образом, ожидали, что ген *GAL4* будет экспрессироваться в тканях ротового аппарата. После этого Гальдер и коллеги создали вторую линию трансгенных мух, разместив кДНК регуляторного гена *Drosophila Pax6* после последовательности, состоящей из пяти сайтов связывания GAL4. Белок GAL4 должен образовываться только в определенной группе клеток, которые призваны сформировать ротовой аппарат, и когда этот белок производится, ему следует вызывать транскрипцию *Pax6* именно в этих клетках (рис. 3.31А). У *Drosophila* и лягушки

(не у мышей) *Pax6* способен превращать некоторые типы развивающихся тканей в глаза (Chow et al., 1999). По всей видимости, у *Drosophila Pax6* не только активирует гены, необходимые для построения глаз, но и подавляет те гены, которые используются для построения других органов.

CRE-LOX-СИСТЕМА

Важным примером экспериментального использования энхансеров стало условное выключение экспрессии гена в определенных типах клеток. Так, транскрипционный фактор Hnf4α экспрессируется в клетках печени, а до образования печени еще и в висцеральной энтодерме желточного мешка. Если у мышиных эмбрионов удалить этот ген, они погибают еще до начала образования печени. Поэтому тому, кто хочет изучить последствия выключения экспрессии данного гена в клетках печени, необходимо создать *условную* мутацию, т. е. такую, которая будет проявляться только в печени и более нигде. Как этого добиться? Парвиз с коллегами (Parviz et al., 2002) достигли этого с использованием сайт-специфичной рекомбинации под названием Cre-lox.

В технологии **Cre-lox** с использованием гомологичной рекомбинации размещают сайты распознавания Cre-рекомбиназы (последовательности *loxP*) внутри гена интереса, обычно фланкируя ими важные экзоны (Kwan, 2002). Такие гены называют «флосированными» («фланкированными *loxP*»). Например, используя культуру эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши, Парвиз с коллегами (Parviz et al., 2002) разместили две последовательности *loxP* по бокам от второго экзона мышиного гена *Hnf4α* (рис. 3.32). С помощью этих ЭСК далее были получены мыши, несущие флосированный аллель. Была создана и вторая линия мышей. Их ген, кодирующий Cre-рекомбиназу бактериофагов (фермент, распознающий последовательности *loxP*), связан с промотором гена альбумина, который экспрессируется на ранних стадиях развития печени. Таким образом, в ходе развития мыши Cre-рекомбиназа будет производиться только в клетках печени. При скрещивании двух линий мышей некоторые из потомков будут нести обе вставки. У таких мышей с двойной мутацией Cre-рекомбиназа (которая производится только в клетках печени) связывается с собственными сайтами узнавания — последовательностями *loxP*, фланкирующими второй экзон генов *Hnf4α*. В этом случае она проявляет свою рекомбиназную активность и вырезает второй экзон. Образовавшаяся ДНК кодирует нерабочий белок, поскольку второй экзон критичен для функционирования *Hnf4α*. Таким образом, произведен нокаут гена *Hnf4α* только в клетках печени.

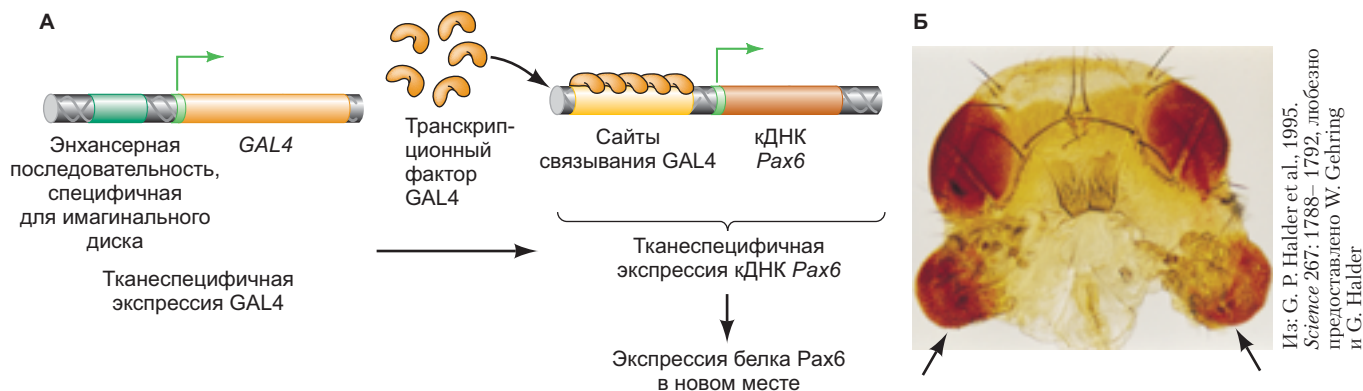
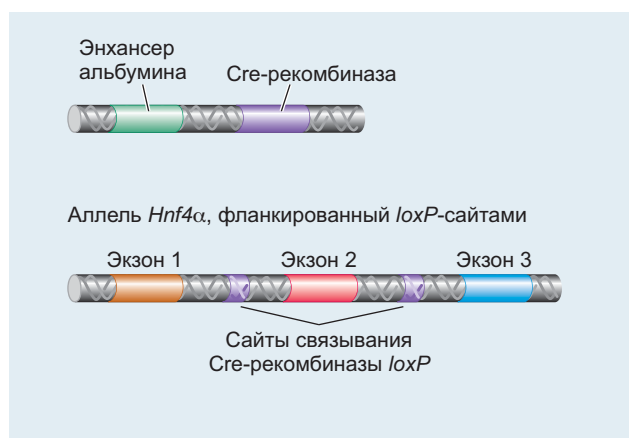


Рис. 3.31. Целевая экспрессия гена *Pax6* в имажинальном диске *Drosophila*, не образующим глаза. **А.** Была сконструирована линия *Drosophila*, в которой ген дрожжевого транскрипционного фактора GAL4 размещен после энхансерной последовательности, которая в норме стимулирует экспрессию генов в имажинальных дисках ротового аппарата. Если эмбрион тоже содержит трансген, в котором сайты связывания GAL4 размещены перед геном *Pax6*, ген *Pax6* будет экспрессироваться в том имажинальном диске, в котором производится белок GAL4. **Б.** Омматидии — фасеточные глаза *Drosophila*, возникающие из ротового аппарата плодовой мушки, в которой в губных (ротовых) имажинальных дисках экспрессировался ген *Pax6*

Система Cre-lox позволяет контролировать характер нокаута или нарушения экспрессии гена в пространстве и времени. Исследователи внедряли стоп-кодны, фланкированные последовательностями *loxP*, чтобы предотвратить транскрипцию некоторого гена, пока стоп-кодон не будет вырезан Cre-рекомбиназой. Более того, экспрессию Cre-рекомбиназы

можно контролировать во времени с использованием эстроген-чувствительного элемента, отвечающего на обработку тамоксифеном. Такой контроль позволяет исследователям активировать гены определенных белков, например репортерных белков типа GFP, которые удерживаются в неактивном состоянии до обработки тамоксифеном.

В большинстве клеток: рекомбинация не идет



Только в клетках печени (экспрессирующих альбумин)

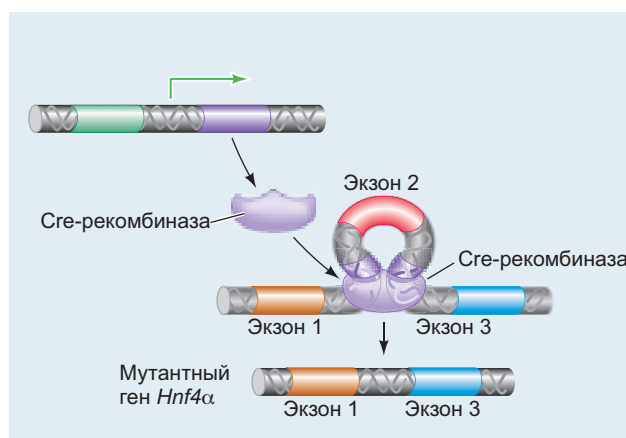
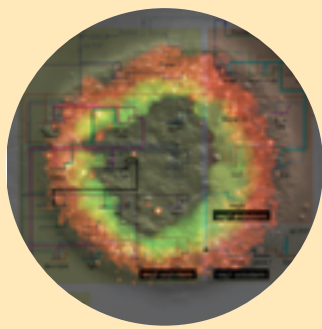


Рис. 3.32. Метод условного мутагенеза Cre-lox позволяет генерировать генные мутации только в конкретных клетках. Создают линии мышей, у которых аллели дикого типа (в данном случае генов, кодирующих транскрипционный фактор *Hnf4a*) заменены аллелями, в которых второй экзон фланкирован последовательностями *loxP*. Этих мышей скрещивают с мышами, у которых ген Cre-рекомбиназы соединен с промотором, активным только в определенных клетках. В данном случае это промотор гена альбумина, который работает на ранних этапах развития печени. У мышей, несущих оба измененных аллеля, Cre-рекомбиназа производится только в клетках, в которых активен этот промотор (т. е. в клетках, синтезирующих альбумин). Cre-рекомбиназа связывается с последовательностями *loxP*, фланкирующими экзон 2, и удаляет его. Таким образом, в описанном здесь случае имеет место утрата функционального гена *Hnf4a* только в клетках развивающейся печени

Послесловие

Все процессы дифференциальной экспрессии генов, обсуждаемые в этой главе, представляют собой стохастические события. Они зависят от концентрации взаимодействующих белков (Cacace et al., 2012; Murugan and Kreiman, 2012; Costa et al., 2013; Neuert et al., 2013). Каждый организм

представляет собой уникальное «событие», которое координируют взаимодействия, указывающие отдельным клеткам, какие гены следует экспрессировать, а какие должны оставаться молчащими. В гл. 4 будут более детально рассмотрены механизмы, с помощью которых клетки взаимодействуют, чтобы организовать дифференциальную экспрессию генов.



Из: I. S. Peter
and E. H. Davidson, 2011.
Nature 474: 635–639

О фотографии в начале главы

Что стоит за клеточной дифференцировкой? Здесь вы видите изображение эмбриона морского ежа через 24 ч после оплодотворения, в разных клетках которого дифференциально экспрессируются *hox11/13b* и *foxa*. Изображение наложено на генно-регуляторную сеть, которая была определена как «основа» развития энтодермы. Генно-регуляторная сеть представляет собой комбинаторные взаимодействия между генами и устанавливает конкретный набор дифференциально экспрессирующихся генов. Такие сети, как эта, используют мириады молекулярных механизмов, обсуждавшихся в этой главе, для контроля экспрессии генов, и в итоге дают наиболее полное определение идентичности данной клетки.

3

Коротко Дифференциальная экспрессия генов

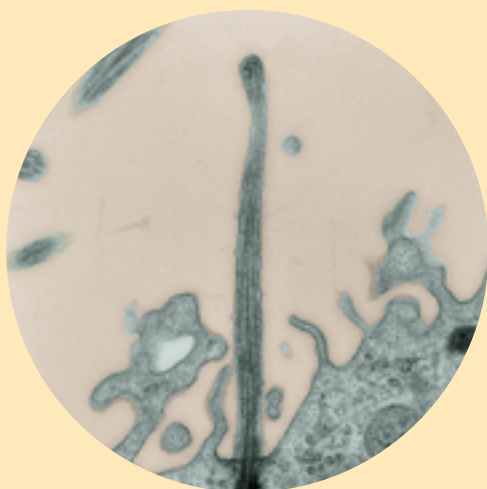
1. Данные молекулярной биологии, клеточной биологии и результаты клонирования ядер соматических клеток показали, что каждая клетка организма (за очень немногими исключениями) несет один и тот же ядерный геном.
2. Дифференциальная экспрессия генов генетически идентичных ядер создает разные типы клеток. Дифференциальная экспрессия генов возможна на уровне транскрипции генов, процессинга пре-мРНК, трансляции мРНК и модификации белка.
3. Хроматин состоит из ДНК и белков. Гистоновые белки образуют нуклеосомы, а метилирование и ацетилирование определенных остатков гистонов может, соответственно, подавлять или активировать транскрипцию генов.
4. Метилирование гистонов часто используют, чтобы приглушить экспрессию генов. Гистоны метилируют метилтрансферазами гистонов и деметилируют деметилазами гистонов.
5. Ацетилированные гистоны часто ассоциированы с активной экспрессией генов. Ацетилтрансферазы гистонов добавляют ацетильные группы к гистонам, в то время как деацетилазы гистонов удаляют их.
6. Гены эукариот содержат промоторные последовательности, с которыми связывается РНК-полимераза II для запуска транскрипции. Чтобы это произошло, РНК-полимеразы связываются с рядом белков, называемых транскрипционными факторами.
7. Эукариотические гены, экспрессирующиеся в определенных типах клеток, имеют энхансерные последовательности, которые регулируют их транскрипцию в пространстве и времени. Энхансеры обычно активируют только гены, расположенные на одной с ними хромосоме. Энхансерные последовательности могут располагаться спереди, сзади и внутри интронов, а могут находиться в миллионах нуклеотидных пар от гена, который активируют. Сайленсеры действуют, подавляя транскрипцию гена в определенных типах клеток.
8. Определенные транскрипционные факторы могут распознавать конкретные последовательности ДНК в промоторных и энхансерных областях. Эти белки активируют или подавляют транскрипцию генов, с которыми связываются.
9. Энхансеры работают в комбинаторной манере. Связывание нескольких транскрипционных факторов может привести к усилению или подавлению транскрипции с определенного промотора. В некоторых случаях транскрипция активируется только в присутствии одновременно фактора А и фактора Б; в других случаях она начинается, если присутствует любой из факторов А и Б.

10. Энхансеры работают модулярно. Ген может иметь несколько энхансеров, каждый из которых управляет экспрессией гена в определенном типе клеток.
11. Транскрипционные факторы регулируют синтез РНК различными способами: стабилизируют связывание РНК-полимеразы II с ДНК, а другие разбирают нуклеосомы, увеличивая эффективность транскрипции.
12. Транскрипционные факторы классов А, В, С, D и Е действуют как гомеостатические белки в определении органов цветка.
13. Даже дифференцированные клетки могут быть конвертированы в клетки других типов посредством активации другого набора транскрипционных факторов-первооткрывателей.
14. Промоторы с низким содержанием CpG обычно метилированы и по умолчанию находятся в выключенном состоянии, но могут быть активированы транскрипционными факторами.
15. Промоторы с высоким содержанием CpG по умолчанию включены и должны активно подавляться за счет метилирования гистонов.
16. Различия в метилировании ДНК могут объяснять явление геномного импринтинга, при котором ген, полученный от сперматозоида, экспрессируется иначе, чем тот же ген, полученный от яйцеклетки. Некоторые гены активны только в том случае, если получены от сперматозоида, или только если они получены от яйцеклетки.
17. Часть хроматина находится в «промежуточном» состоянии, чтобы быстро реагировать на сигналы в ходе развития. В промоторах с высоким содержанием CpG РНК-полимераза II связывается с промежуточным хроматином, не запуская транскрипцию, а гистоны несут как активирующие, так и репрессивные метки.
18. Альтернативный сплайсинг пре-мРНК может создавать семейства связанных белков за счет прочтения различных областей пре-мРНК как экзонов или интронов. В зависимости от того, какие факторы распознавания сайтов сплайсинга присутствуют в клетке, последовательность, которая в одних обстоятельствах является экзоном, в других будет интроном. Образующиеся белки (сплайс-изоформы) могут играть различные роли и приводить к развитию альтернативных фенотипов или заболеваний.
19. Некоторые матрицы транслируются только в определенное время. В частности, в ооците используется трансляционная регуляция, чтобы «отложить» часть матриц, которые транскрибируются в ходе развития ооцита, но используются лишь после оплодотворения. Такая активация часто осуществляется за счет удаления ингибирующих белков или полиаденилирования матрицы.
20. МикроРНК могут служить в качестве ингибиторов трансляции, связываясь с 3'-НТО РНК. Микро-РНК привлекают РНК-индуцируемый комплекс выключения генов, который либо предотвращает трансляцию, либо направляет мРНК на деградацию.
21. Многие мРНК локализуются в определенных областях ооцитов или других клеток. Такую локализацию, по-видимому, регулирует 3'-НТО мРНК.
22. Рибосомы могут различаться в отдельных типах клеток, и рибосомы одних клеток могут транслировать определенные мРНК эффективнее, чем рибосомы других клеток.
23. Изучать дифференциальную экспрессию генов позволил спектр молекулярных инструментов, включающий визуализацию экспрессии генов путем гибридизации *in situ*, идентификацию регуляторных связывающих белки областей ДНК методом ChIP-Seq, а также нокдаун (за счет РНК-интерференции) и нокаут (с помощью CRISPR/Cas9) генов для проверки их функций.
24. Дифференциальная экспрессия генов больше похожа на интерпретацию музыкальной партитуры, чем на расшифровку кода. Ее составляет множество событий, каждое из которых связано с другими ее компонентами.

Межклеточная коммуникация: механизмы морфогенеза

4

Не может ли это быть клеточной
антенной? Для чего она нужна?



Из: A. Alvarez-Buylla et al., 1998.
J. Neurosci 18: 1020–1037

Развитие — нечто большее, чем дифференцировка. Клеточные типы в организме не расположены случайным образом. Они формируют организованные структуры, будь то конечность или сердце. Кроме того, наши пальцы состоят из тех же типов клеток — костных, хрящевых, нейронов, клеток крови и т. п. — из каких составлены ноги или таз. Они должны каким-то путем получить указания к созданию других форм и образованию других связей. Такая организация формы — **морфогенез** — стала одной из величайших загадок человечества.

В середине XX в. Эрнест Э. Джаст (1939) и Йоханнес Хольтфретер (Townes and Holtfreter, 1955) предсказали, что эмбриональные клетки могут различаться компонентами клеточных мембран, и именно эти различия определяют формирование органов. В конце XX в. начали открывать и описывать эти мембранные компоненты — молекулы, благодаря которым эмбриональные клетки прикрепляются, мигрируют и вызывают экспрессию генов в соседних клетках. Сегодня мы начинаем понимать, как клетки интегрируют информацию из ядра и из окружения, занимая свое место в сообществе, благодаря чему происходят уникальные морфогенетические события, и моделируем на основе этих знаний пути и сети.

Как обсуждалось в гл. 1, клетки зародыша являются либо эпителиальными, либо мезенхимными (см. табл. 1.1). Эпителиальные клетки прикреплены друг к другу и могут образовывать листы и трубки, тогда как мезенхимные клетки могут мигрировать индивидуально или группой. Образование и использование разнообразных внеклеточных матриксов оказывает глубокое влияние на организацию эпителиальных и мезенхимных клеток. По-видимому, существует всего несколько процессов, посредством которых клетки создают структурированные органы (Newman and Bhat, 2008), и во всех принимают участие клеточ-

ная поверхность и взаимодействия между эпителием и подлежащей мезенхимой. В этой главе основное внимание будет уделено трем механизмам, основанным на межклеточной коммуникации через поверхность клеток: клеточной адгезии, изменению формы клеток и передаче сигналов между ними.

Основы межклеточной коммуникации

На любой стадии эмбрион поддерживают в целости, организуют и формируют межклеточные взаимодействия, которые определяют и методы коммуникации клеток. Давайте рассмотрим, как мы общаемся друг с другом. Вначале один человек должен подать голос или дать некий сигнал, который будет услышан или получен другим человеком и вызовет определенный ответ (объятие, смену позы или даже сарказм). Молекулярная коммуникация между клетками в основном обусловлена разнообразными и специфичными белок-белковыми взаимодействиями, которые спо-

собны вызывать разнообразные клеточные реакции от изменений в транскрипции генов и метаболизма глюкозы до деления и гибели. Взаимодействия (или *коммуникации*) между клетками, а также между клетками и окружающей их средой начинаются с клеточной мембраны, с белков, размещенных на ней, прикрепленных к ней или секретируемых через нее.

Клеточная коммуникация в эмбрионе может происходить между соседними клетками, находящимися в прямом контакте, что называют **юкстакринными взаимодействиями**, или же на расстоянии, через секрецию белков во внеклеточный матрикс, и тогда говорят о **паракринных взаимодействиях** (рис. 4.1). Белки, выделяемые клетками с целью вызвать ответ в других клетках, обычно называют сигнальными белками или **лигандами**, тогда как белки в мембране, связывающие другие мембранассоциированные белки или сигнальные белки, называют **рецепторами**. В случае когда рецептор на мембране одной клетки связывается с рецептором того же типа на другой клетке, имеет место **гомофильное связывание**. **Гетерофильное связывание** происходит между различными типами рецепторов (рис. 4.1А).

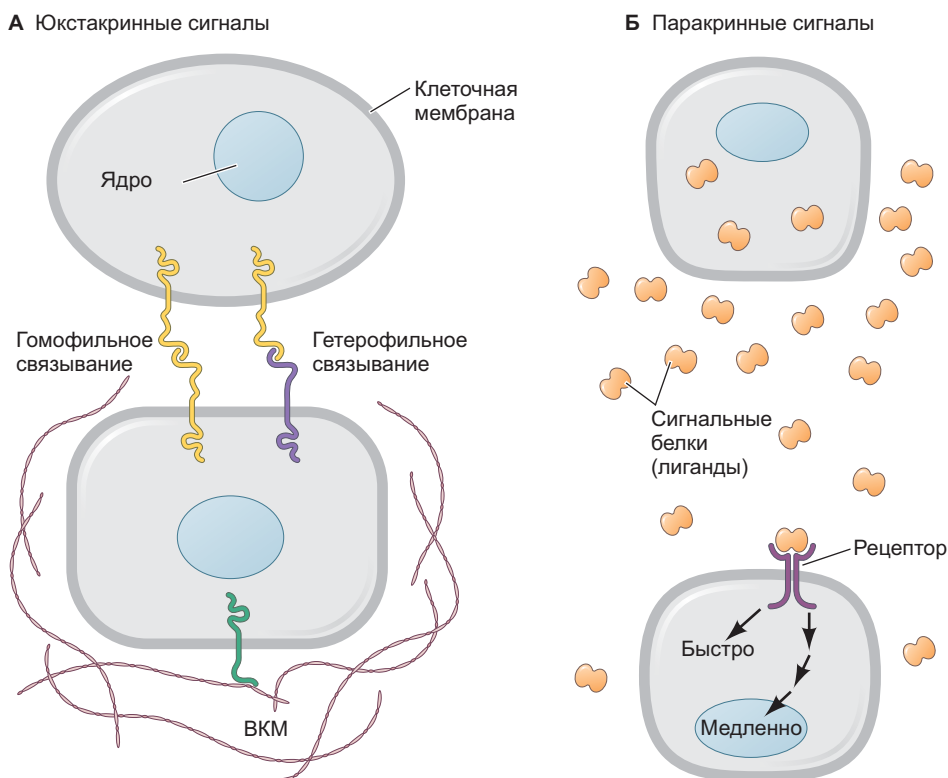


Рис. 4.1. Модели межклеточной коммуникации: локальный и на расстоянии. **А.** Локальный обмен сигналами происходит путем связывания мембранных рецепторов с белками внеклеточного матрикса (ВКМ) или напрямую с рецепторами соседней клетки в ходе так называемого юкстакринного взаимодействия. **Б.** Один из механизмов обмена сигналами на расстоянии — паракринное взаимодействие, в ходе которого одна клетка выделяет в среду сигнальный белок (лиганд), распространяющийся на много клеточных диаметров. Только клетки, экспрессирующие соответствующий этому лиганду рецептор, могут ответить на него быстрыми реакциями в цитозоле или более медленными изменениями экспрессии генов и синтеза белков

Как обеспечена адресная коммуникация для получения определенного клеточного ответа? Белок-белковые взаимодействия и модификации белка обычно приводят к изменению формы или *конформации* вовлеченных белков. Такое пространственное изменение снаружи клетки меняет форму рецептора внутри клетки, что в свою очередь может придать внутриклеточной части рецептора новые свойства. Он приобретает способность активировать ферментативные реакции, из которых состоит путь передачи сигнала. Часто передача сигнала происходит через последовательность конформационных изменений в молекулах, вовлеченных в сигнальный путь, — изменений, реализуемых путем связывания фосфатных групп или других небольших молекул (цАМФ, Ca^{2+}), и в итоге приводят к клеточным реакциям. Пути передачи сигнала, кульминацией которых является активация экспрессии генов в ядре, обычно медленнее тех, которые ферментативно активируют биохимические пути или регулируют белки цитоскелета, влияя на физиологические функции или движение клетки соответственно. Эти сигнальные пути имеют основополагающее значение для развития животных и растений.

Адгезия и сортировка: юкстакринные взаимодействия и физика морфогенеза

Как происходит образование отдельных тканей из популяций клеток, а органов из тканей? Как органы образуются в определенных местах, а мигрирующие клетки достигают своих пунктов назначения? Например, за счет чего остеобласты прикрепляются к другим остеобластам для образования кости, вместо того чтобы объединиться с соседними клетками капилляров или мышечными клетками? Что отделяет мезодерму от эктодермы, в результате чего кожа имеет дерму и эпидермис?

Существует ли общий ответ на все эти вопросы? В конце концов, эмбрион от молекул РНК до кровеносной системы подчинен тем же физическим законам, которые определяют весь наш мир. Рассмотрим фигуру из песка (**рис. 4.2**). Термодинамические свойства, определяющие поверхностное натяжение между молекулами воды и песчинками, удерживают части снеговика Олафа вместе. Кроме того, солнечный свет, попадающий на эту скульптуру, вызывает *перепад* температур между поверхностью и внутренней частью и, соответственно, испарение воды; в результате адгезия между песчинками будет быстро уменьшаться на поверхности, в то время как в центре они будут сцеплены плотно (конечно, до прилива). Могут ли эти же термодинамические принципы определять связи между клетками, подерживающие морфогенез эмбриона?

Дифференциальное сродство клеток

Можно сказать, что экспериментальный анализ морфогенеза был начат в 1955 г., когда Таунс и Гольтфрертер провели опыты по рекомбинации клеток. Вначале они помещали эмбриональные ткани амфибий в щелочной раствор, в котором те диссоциировали на отдельные клетки. Затем Таунс и Гольтфрертер могли наблюдать, как реагируют клетки одного типа ткани на рекомбинацию с клетками, полученными из других тканей.

Результаты экспериментов были поразительны. Таунс и Гольтфрертер обнаружили, что клетки реагируют, причем различные типы клеток при этом разделяются в пространстве, т. е. два типа клеток не остаются перемешанными, а сортируются так, что каждый тип занимает свое место. Таким образом, когда эпидермальные (эктодермальные) и мезодермальные клетки объединяют в смешанный агрегат, эпидермальные клетки перемещаются к его периферии, а мезодермальные внутрь (**рис. 4.3**). Очень важно, что исследователи обнаружили соответствие



© M. J. F. Barrisi

Рис. 4.2. Эту скульптуру диснеевского персонажа — снеговика Олафа — удерживает в целости адгезия между зернами песка

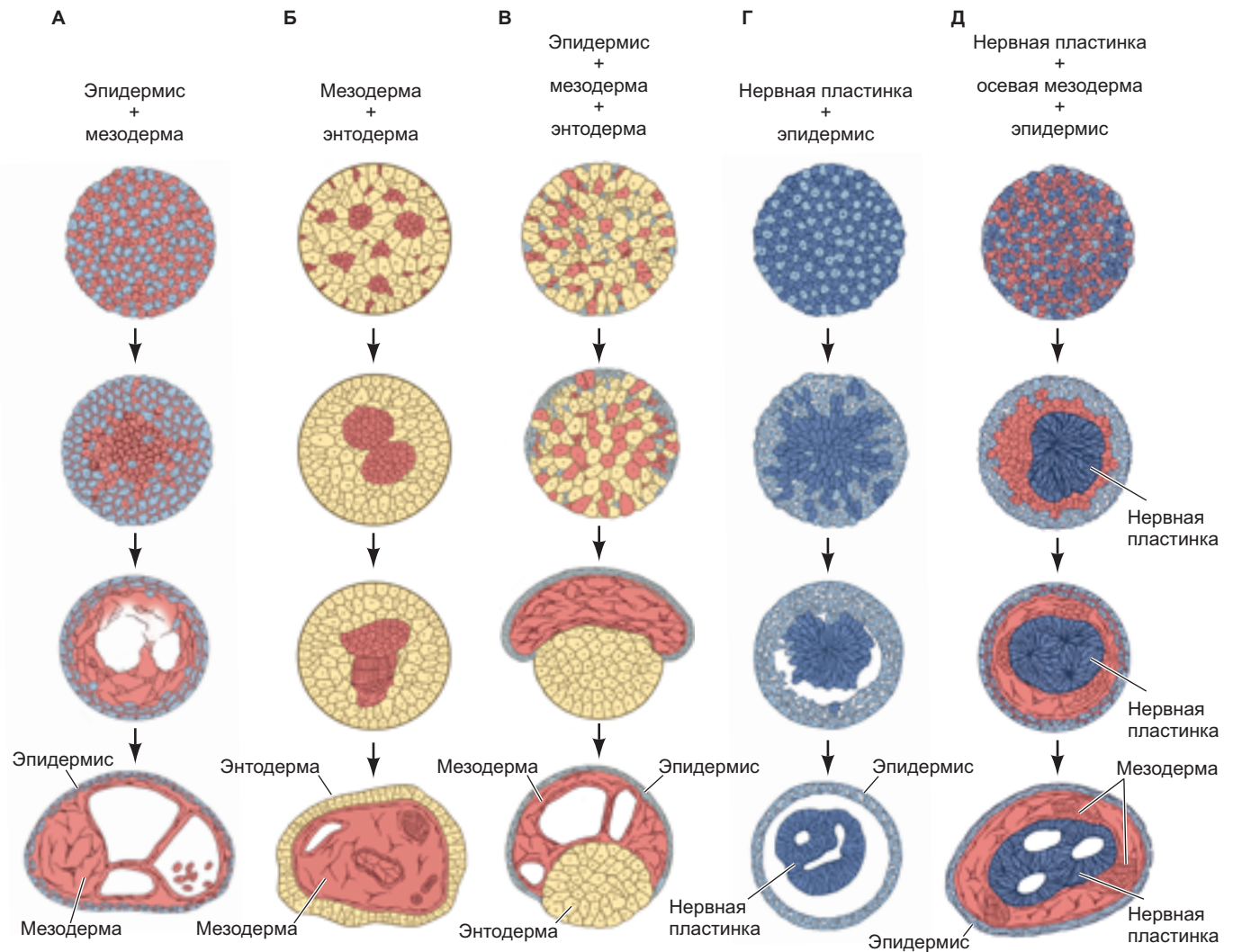
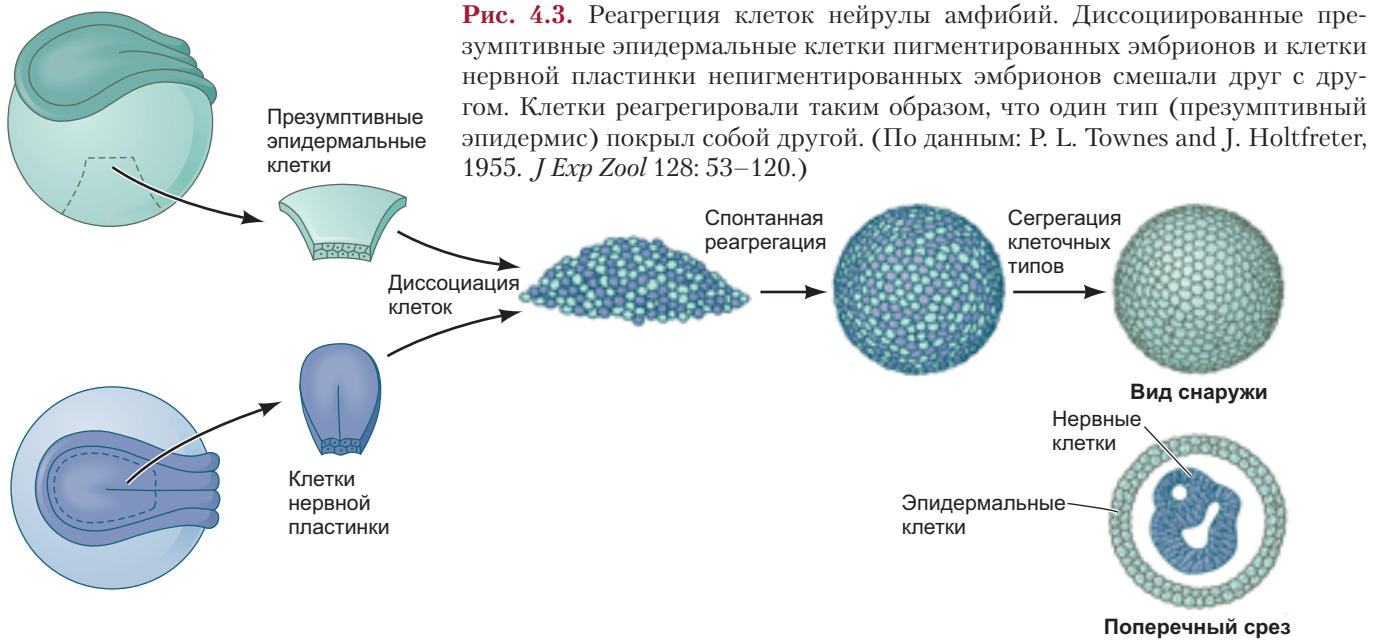


Рис. 4.4. Сортировка клеток и восстановление пространственных отношений между ними в агрегатах эмбриональных клеток амфибий. (По данным: P. L. Townes and J. Holtfreter, 1955. *J Exp Zool* 128: 53–120.)

между конечным положением реагрегированных клеток и их положением в эмбрионе. Реагрегированная мезодерма смещается в центр по отношению к эпидермису, присоединяясь к его внутренней поверхности (рис. 4.4А). Удивительно, что так же мезодерма ведет себя по отношению к кишечной энтодерме, когда эпидермис отсутствует (рис. 4.4Б). Однако, когда смешивают три зародышевых листка, эпидермис и мезодерма отделяются от энтодермы и обволакивают ее (рис. 4.4В). В итоге эпидермис оказывается на периферии, энтодерма внутри, а мезодерма лежит между ними. Гольцфрертер приписал эти результаты проявлению **селективного сродства** клеток.

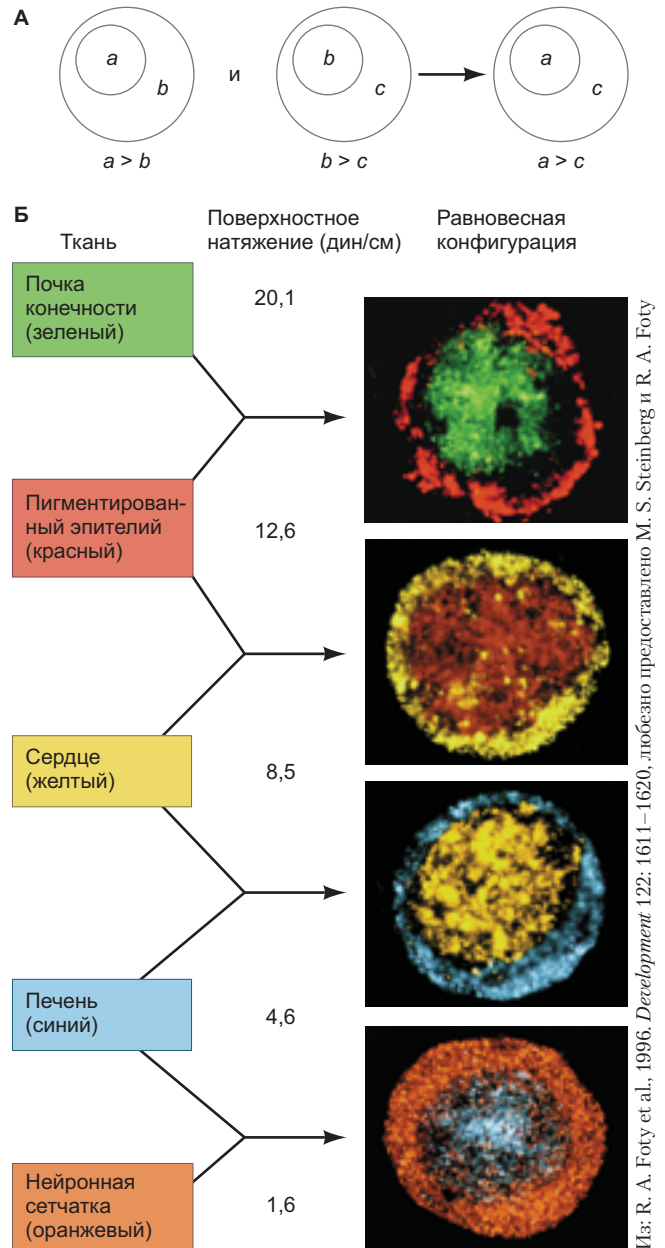
Сходство клеточных агрегатов с нормальными структурами эмбриона можно наблюдать и при рекомбинации клеточных типов в пределах одного зародышевого листка, например эктодермальных клеток эпидермиса и нервной пластинки (рис. 4.4Г). Презумптивный эпидермис, как всегда, мигрирует на периферию; клетки нервной пластинки мигрируют внутрь, образуя структуру, напоминающую нервную трубку. Когда к суспензии презумптивных эпидермальных и презумптивных нейральных клеток добавляют клетки осевой мезодермы (хорды), сегрегация клеток приводит к образованию внешнего эпидермального слоя, центрально расположенной нейральной ткани и слоя мезодермальной ткани между ними (рис. 4.4Д). *Каким-то образом клетки оказываются способными рассортировываться, занимая свое нормальное положение в эмбрионе!*

Гольцфрертер и его коллеги пришли к выводу, что селективное сродство клеток меняется в процессе развития. Для нормального развития необходимо, чтобы в определенные моменты времени клетки по-разному взаимодействовали с другими клеточными популяциями. Такие изменения сродства клеток чрезвычайно важны для процессов морфогенеза.

Термодинамическая модель взаимодействия клеток

Клетки, как мы увидели, не сортируются случайным образом, а активно перемещаются, создавая структуру тканей. Что вызывает направленное движение клеток во время морфогенеза? В 1964 г. Малкольм Штейнберг предложил **гипотезу дифференциальной адгезии** — модель, призванную объяснить закономерности сортировки клеток на основе термодинамических принципов. Используя диссоциированные клетки, полученные из обработанных трипсином¹ эмбриональных тканей, Штейнберг показал, что определенные типы клеток при рекомбинации с одними типами мигрируют в центр, а с другими — на пе-

рифирию. Эти взаимодействия следовали иерархии поведения (Steinberg, 1970). Если клетки первого типа А занимают внутреннее положение по отношению к клеткам второго типа Б, а клетки Б — внутреннее положение по отношению к клеткам третьего типа В, то и клетки А всегда будут оказываться внутри по отношению к клеткам В (рис. 4.5А; Foty



Из: R. A. Foty et al., 1996. *Development* 122: 1611–1620, любезно предоставлено M. S. Steinberg и R. A. Foty

Рис. 4.5. Иерархия сортировки клеток по убыванию поверхностного натяжения. **А.** Простая схема, демонстрирующая логику свойств дифференциальной адгезии клеток. **Б.** Равновесная конфигурация отражает силу сцепления клеток, причем типы клеток с большей клеточной адгезией сегрегированы внутри и окружены клетками с меньшей адгезией. Изображения получены на срезах агрегатов, цвета для типов клеток заданы условно с помощью компьютера. Черные области представляют собой клетки, сигнал которых был вырезан в программе оптимизации изображения

¹ Трипсин — наиболее часто используемый фермент для расщепления белковых соединений на клеточной поверхности, приводящего к диссоциации клеток в культуре.

and Steinberg, 2013). Например, пигментированные клетки сетчатки мигрируют под нейральные клетки сетчатки, а клетки сердца мигрируют под пигментированные клетки сетчатки. Следовательно, клетки сердца должны мигрировать под нейральные клетки сетчатки — именно это они и делают. Это наблюдение побудило Штейнберга предположить, что клетки взаимодействуют так, чтобы образовать агрегаты с минимальной свободной энергией на границе фаз. Другими словами, клетки перестраиваются в наиболее термодинамически устойчивую структуру. Если сила адгезии клеточных типов А и Б различна и сила взаимодействия А–А больше, чем А–Б и Б–Б, будет происходить сортировка с выделением клеток А в центр. Однако, если сила взаимодействия А–А меньше или равна силе взаимодействия А–Б, клетки в агрегате останутся случайно перемешанными. Согласно этой гипотезе, ранний эмбрион существует в равновесном состоянии до изменения адгезивных свойств клеточных мембран. Движения, которые возникают в результате этого изменения, стремятся привести клетки к новой равновесной конфигурации. Гипотеза дифференциальной адгезии гласит: все, что требуется для сортировки, — это различия в силе адгезии у разных клеточных типов.

В нескольких тщательных экспериментах с использованием многочисленных типов тканей было показано, что клетки с большей поверхностной адгезией мигрируют в центр, если их объединить с клетками, обладающими меньшим поверхностным натяжением (рис. 4.5Б; Foty et al., 1996; Krens and Heisenberg, 2011). В простейшей форме этой модели все клетки могут иметь один и тот же тип «клея» на поверхности. Количество «клея» или клеточная архитектура, позволяющая дифференцированно распределять такое вещество по поверхности, может создать разницу в количестве стабильных связей между клетками разных типов. В более конкретной версии модели термодинамические различия могут быть вызваны различными типами молекул адгезии (Moscona, 1974). Когда исследования Гольцфретера были возобновлены с использованием современных методов, оказалось, что поверхностные натяжения ткани для отдельных зародышевых листков были именно такими, которые требуются для получения особенностей разделения, наблюдаемых как *in vitro*, так и *in vivo* (Davis et al., 1997).

Кадгерины и клеточная адгезия

Данные показывают, что границы между тканями действительно могут быть сформированы за счет того, что разные типы клеток обладают разными типами и разным количеством молекул клеточной адгезии. Клеточную адгезию опосредует несколько классов молекул, но ее основными молекулами, по-видимому, остаются кадгерины.

Как следует из названия, **кадгерины** — зависимые от кальция молекулы адгезии. Они имеют решающее значение для установления и поддержания межклеточных связей и, по-видимому, не менее значимы для пространственной сегрегации типов клеток и организации формы живого (Takeichi, 1987). Кадгерины как трансмембранные белки взаимодействуют с другими кадгеринами соседних клеток. Они закрепляются внутри клетки с помощью комплекса белков, называемых **катенинами** (рис. 4.6), а кадгерин-катениновые комплексы образуют классические адгезивные контакты, помогающие скреплять эпителиальные клетки. Более того, поскольку кадгерины и катенины связываются с актиновым цитоскелетом клетки (микрофиламентами), они объединяют эпителиальные клетки в механическую единицу. Блокирование *функции* кадгерина (с помощью антител, которые связывают и инактивируют кадгерин) или блокирование *синтеза* кадгерина (с помощью антисмысловой РНК, связывающей молекулы мРНК кадгерина и предотвращающей их трансляцию) может прервать образование эпителиальных тканей и вызвать дезагрегацию клеток (Takeichi et al., 1979).

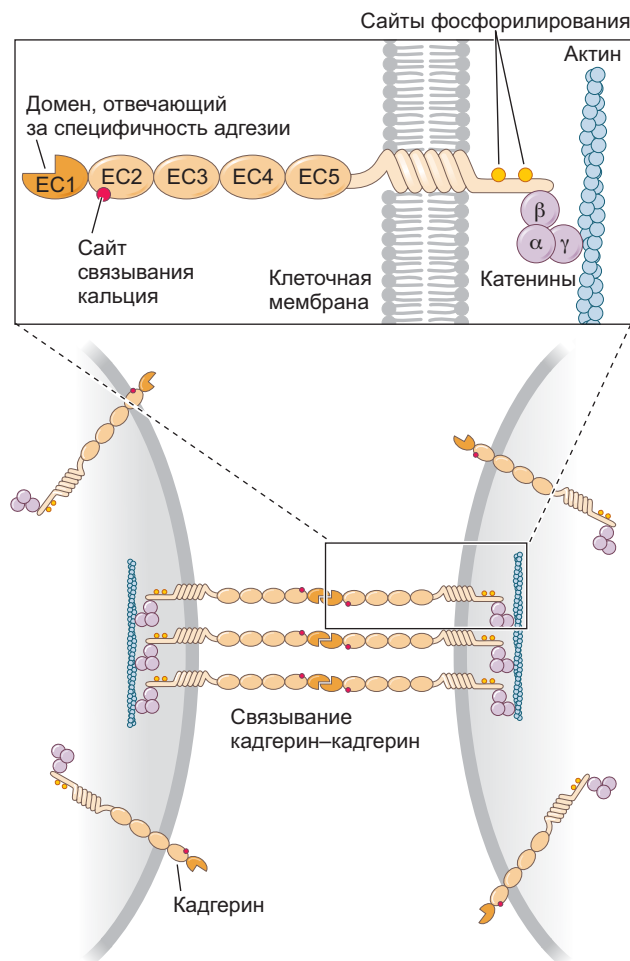


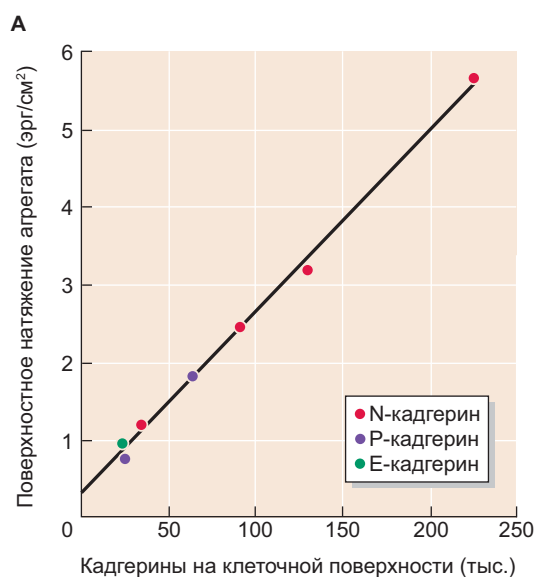
Рис. 4.6. Схема крепления кадгерина к цитоскелету через катенины. (По данным: M. Takeichi et al., 1991. *Science* 251: 1451–1455.)

Кадгерины выполняют несколько связанных функций. Во-первых, их внешние домены служат для сцепления клеток. Во-вторых, кадгерины связываются с актиновым цитоскелетом и помогают собирать его, тем самым обеспечивая механические силы для формирования листов и трубок. В-третьих, они могут инициировать и передавать сигналы, приводящие к изменениям экспрессии генов в клетке.

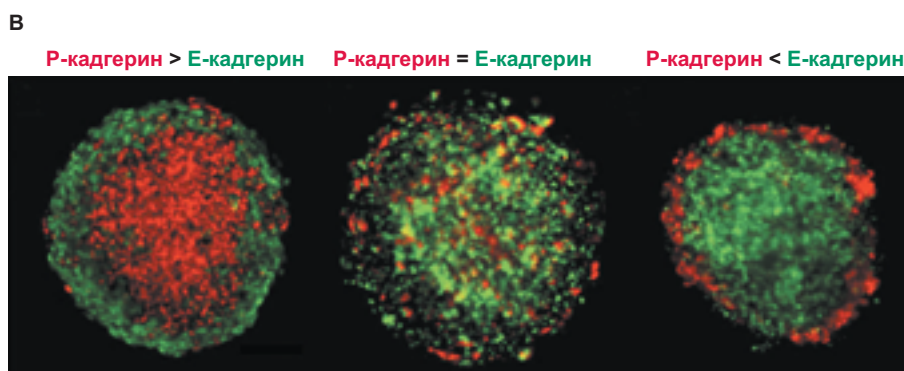
КОЛИЧЕСТВО И КОГЕЗИЯ

Способность клеток самостоятельно разделяться в зависимости от количества экспрессируемого кадгерина была впервые показана с использованием двух

клеточных линий, идентичных во всех отношениях, кроме экспрессируемого количества Р-кадгерина. Когда эти две группы клеток были смешаны, клетки, экспрессировавшие больше Р-кадгерина, обладали более высокой поверхностной адгезией и мигрировали внутрь по отношению к клеткам, экспрессирующим меньше Р-кадгерина (Steinberg and Takeichi, 1994; Foty and Steinberg, 2005). Далее исследователи продемонстрировали, что количественный кадгерин-зависимый сортинг кадгерина, напрямую связан с поверхностным натяжением (рис. 4.7А, Б). Поверхностное натяжение таких *гомотипичных* агрегатов (в которых все клетки имеют одинаковый тип кадгерина) линейно зависит от количества кадгерина на клеточной поверхности, таким образом иерар-



Ис: R. A. Foty and M. S. Steinberg, 2005. *Dev Biol* 278: 255–263



Ис: D. Duguay et al., 2003. *Dev Biol* 253: 309–323

Рис. 4.7. Важность количества кадгеринов для нормального морфогенеза. **А.** Поверхностное натяжение агрегата коррелирует с количеством молекул кадгерина на мембранах клеток. **Б.** Разделение двух субклонов с различным содержанием кадгерина на клеточной поверхности. Клетки, окрашенные зеленым, содержат на мембране в 2,4 раза больше молекул N-кадгерина, чем красные клетки. (У этих клеток не экспрессируются нормальные гены кадгеринов.) Через 4 ч инкубации (слева) клетки распределены случайным образом, но через 24 ч (справа) красные клетки (с поверхностным натяжением около 2,4 эрг/см²) образуют оболочку вокруг более тесно сцепленных (5,6 эрг/см²) зеленых клеток. **В.** Разделение клеток может быть основано на содержании кадгеринов, даже если две клетки экспрессируют разные кадгерины (т. е. гетеротипичны). Красным цветом показан Р-кадгерин, зеленым — Е-кадгерин. (Рис. А, Б из: R. A. Foty and M. S. Steinberg, 2005. *Dev Biol* 278: 255–263.)

хия разделения клеток основана строго на количестве кадгериновых контактов между клетками. Этот термодинамический принцип применим и к *гетеротипичным* агрегатам, в которых относительное количество отдельных типов кадгеринов также предсказывает поведение разделяющихся клеток *in vitro* (рис. 4.7В; Foty and Steinberg, 2013).

Внеклеточный матрикс как источник сигналов для развития

Межклеточные взаимодействия не происходят в отсутствие окружения; они скоординированы и зачастую обусловлены средой вокруг клетки. Окружение называют **внеклеточным матриксом**, и она представляет собой нерастворимую сеть из выделяемых клетками макромолекул. Макромолекулы образуют область неклеточного материала в промежутках между клетками. Клеточная адгезия, миграция клеток и образование эпителиальных слоев и трубок зависят от способности клеток образовывать связи с внеклеточным матриксом. В таких случаях, как формирование эпителия, эти связи должны быть чрезвычайно сильными. В других случаях, например при миграции клеток, связи должны возникать, разрушаться и создаваться вновь. В одних случаях внеклеточный матрикс служит всего лишь благоприятным субстратом для адгезии и миграции; в других может содержать важные руководства и сигналы спецификации для направленного движения и дифференцировки клеток соответственно. Внеклеточный матрикс состоит из белка коллагена, протеогликанов и множества

специализированных молекул гликопротеинов, таких как фибронектин и ламинин.

Протеогликаны — крупные внеклеточные белки с гликозаминогликановыми полисахаридными боковыми цепями — часто определяют способность матрикса представлять клеткам информативные сигналы, например паракринные факторы. Двумя наиболее распространенными гликозаминогликанами являются гепарансульфат и хондроитинсульфат. Гепарансульфат может связывать многие факторы из различных паракринных семейств и, по-видимому, необходим для представления высоких концентраций паракринных факторов их рецепторам. У *Drosophila*, *C. elegans* и мышей мутации, препятствующие синтезу протеогликанов, блокируют нормальную клеточную миграцию, морфогенез и дифференцировку (García-García and Anderson, 2003; Hwang et al., 2003; Kirn-Safran et al., 2004).

Большие гликопротеины в составе внеклеточного матрикса ответственны за организацию матрикса и связанных с ним клеток в упорядоченную структуру. **Фибронектин** представляет собой очень крупный (460 кДа) димер гликопротеина, способный образовывать различные четвертичные структуры с длинными волокнами, называемыми фибронектиновыми фибриллами. Фибронектин обычно служит в качестве промежуточной адгезивной молекулы, связывающей клетки друг с другом и с другими субстратами, такими как коллаген и протеогликаны. Фибронектин имеет несколько различных сайтов связывания, и их взаимодействие с соответствующими молекулами клеточной поверхности (а именно интегринами) приводит к правильному выстраиванию к пучкам фибрилл клеток с ориентацией сборок фибрилл (рис. 4.8А).

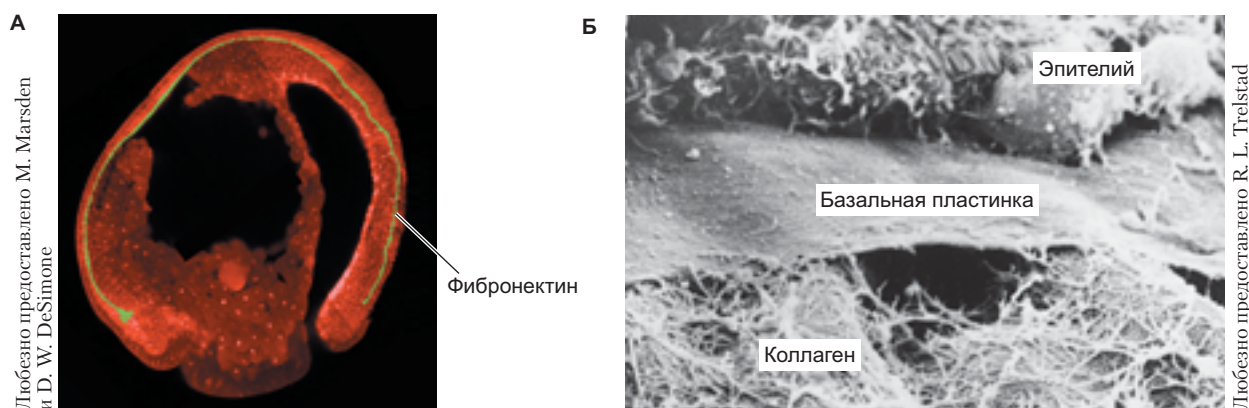


Рис. 4.8. Внеклеточный матрикс развивающегося эмбриона. **А.** Флуоресцентные антитела к фибронектину показывают его отложение в гастрале *Xenopus* в виде зеленой полосы. Фибронектин направляет движение мезодермальных клеток. **Б.** Фибронектин связывает мигрирующие клетки, гепарансульфат, коллаген и другие белки внеклеточного матрикса. На этой сканирующей электронной микрофотографии показан внеклеточный матрикс в месте соединения эпителиальных клеток (*сверху*) и мезенхимных клеток (*снизу*). Эпителиальные клетки выделяют плотную базальную пластинку на основе ламинина, в то время как мезенхимные клетки выделяют рыхлую ретикулярную пластинку, образованную в основном коллагеном. Вместе базальная и ретикулярная пластинки образуют базальную мембрану



Загадки развития

Недавно была предложена «гипотеза дифференциального межфазного натяжения», согласно которой сократительная способность кортекса клетки управляет сортировкой клеток в большей степени, чем адгезия между клетками. По мере появления все более совершенных инструментов для количественного измерения *in vivo* сил на клеточном и молекулярном уровнях, будет интересно узнать, как дифференциальная адгезия и дифференциальное межфазное натяжение совместно регулируют морфогенез. В ближайшие годы следите за тем, как будет дополнено наше понимание роли биофизических свойств в механизмах морфогенеза.

Фибронектин играет важную роль и в миграции клеток в качестве материала, которым «вымощены» некоторые пути их движения. Фибронектиновые пути ведут зародышевые клетки к гонадам, а клетки сердца — к средней линии зародыша. Если эмбрионам цыплят вводят антитела, блокирующие фибронектин, образующие сердце клетки не достигают средней линии и производят два отдельных сердца (Heasman et al., 1981; Linask and Lash, 1988).

Ламинин (другой крупный гликопротеин) и **коллаген IV типа** служат основными компонентами разновидности внеклеточного матрикса, называемой **базальной пластинкой**. Базальная пластинка представлена тесно сплетенными листами, лежащими под эпителиальными тканями (рис. 4.8Б). Адгезия эпителиальных клеток к ламинину (на котором они сидят) намного больше, чем сродство мезенхимных клеток к фибронектину (связи с которым они образуют и разрушают в ходе миграции). Как и фибронектин, ламинин играет роль в сборке внеклеточного матрикса, способствуя адгезии и росту клеток, изменяя форму клеток и обеспечивая их миграцию (Nakamori et al., 1984; Morris et al., 2003).

Интегрины: рецепторы молекул внеклеточного матрикса

Способность клетки связываться с адгезивными гликопротеинами, такими как ламинин или фибронектин, зависит от присутствующих на ее мембране рецепторов для сайтов связывания этих больших молекул (Chen et al., 1985; Knudsen et al., 1985). Было обнаружено, что основными рецепторами фибронектина служат очень большие белки, способные присоединять фибронектин снаружи клетки, пронизывать мембрану и связываться с белками цитоскелета внутри клетки (рис. 4.9). Рецепторные белки этого семейства называют интегринами, поскольку они *интегрируют* внеклеточные и внутриклеточные

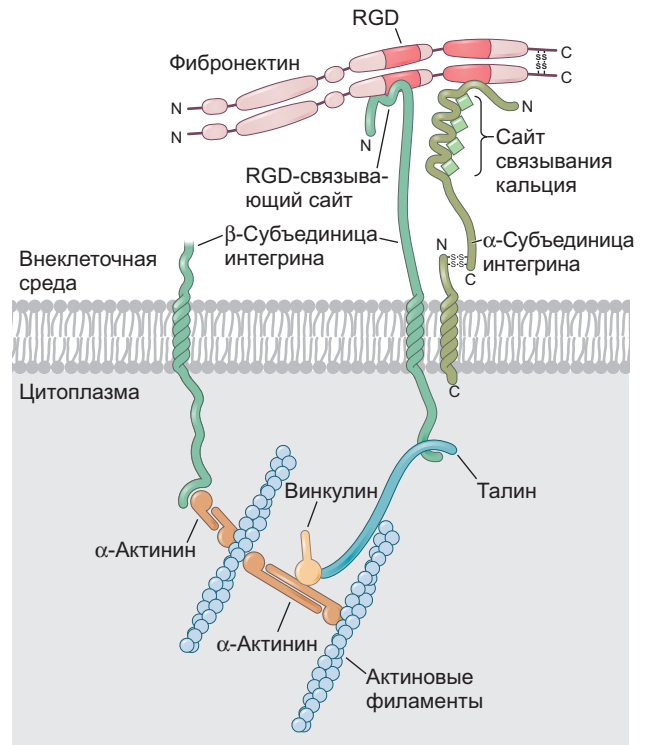


Рис. 4.9. Схема рецепторного комплекса фибронектина. Интегрины в его составе могут образовывать гетеродимерные трансмембранные рецепторные белки, связывающие фибронектин на внешней поверхности клетки и одновременно взаимодействующие с белками, относящимися к актиновому цитоскелету, — α -актинином, винкулином, талином — внутри клетки. RGD — аргинин–глицин–аспарагиновая кислота. (По данным: E. J. Luna and A. L. Hitt, 1992. *Science* 258: 955–964.)

структуры, позволяя им работать вместе (Hordevz et al., 1986; Tamkun et al., 1986).

На наружной стороне интегрины связываются с аминокислотной последовательностью аргинин — глицин — аспарагиновая кислота (RGD), обнаруженной в нескольких адгезивных белках внеклеточного матрикса, включая фибронектин и ламинин (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). На цитоплазматической стороне интегрины связываются с двумя белками, талином и α -актинином, которые соединяются с актиновыми филаментами. Двойное связывание позволяет клетке двигаться, сокращая актиновые филаменты, вопреки неподвижному внеклеточному матриксу.

Интегрины могут также передавать сигналы снаружи клетки внутрь, изменяя экспрессию генов (Walker et al., 2002). Показано, что интегрины имеют решающее значение для индукции специфичной экспрессии генов в развивающихся тканях, особенно в печени, семенниках и молочных железах (Bissell et al., 1982; Martins-Green and Bissell, 1995).

Эпителио-мезенхимный переход

Все процессы, которые мы успели обсудить в той главе, объединяет важнейший феномен развития — **эпителио-мезенхимный переход**, или **EMT**. EMT представляет собой упорядоченную последовательность событий, посредством которых эпителиальные клетки превращаются в мезенхимные. В этом переходе поляризованная стационарная эпителиальная клетка, обычно взаимодействующая с базальной пластинкой своей базальной поверхностью, становится мигрирующей мезенхимной клеткой, способной проникать в ткани и помогать формировать органы в новых местах (**рис. 4.10А**; см. Sleepman and Thiery, 2011). EMT обычно инициируется, когда паракринные факторы соседних клеток изменяют экспрессию в генах-мишенях, что изменяет или снижает экспрессию кадгеринов путем разблокирования их прикрепления к другим клеткам, или интегринов, высвобождая их от прикрепления к компонентам базальной мембраны. Одновременно происходит выделение ферментов, разрушающих базальную пластинку, что позволяет клеткам-мишеням выходить из эпителия. Такие изменения часто включают перестройки актинового

цитоскелета клеток-мишеней и секрецию новых молекул внеклеточного матрикса, характерных для мезенхимных клеток.

Эпителио-мезенхимный переход чрезвычайно важен в развитии (**рис. 4.10Б, В**). Примеры процессов развития, при которых происходит EMT, включают: 1) образование клеток нервного гребня из дорсальной области нервной трубки; 2) образование мезодермы у куриных эмбрионов, в ходе которого клетки в составе эпителиального слоя становятся мезодермальными и мигрируют внутрь эмбриона; 3) образование клеток-предшественников позвонков из сомитов, в ходе которого клетки отделяются от сомита и мигрируют вокруг развивающегося спинного мозга. EMT важен и для взрослого организма, например при заживлении ран. Однако наиболее яркую форму EMT у взрослых наблюдают при метастазировании рака, когда клетки в составе солидной опухоли покидают опухолевый эпителий, проникая в другие ткани в виде мигрирующих мезенхимных клеток, образуя вторичные опухоли в других частях тела. Похоже, что при метастазировании реактивируются процессы, вызывающие клеточный переход в эмбрионе, что позволяет раковым клеткам мигрировать и становиться инвазивными. Кадгерины оказываются

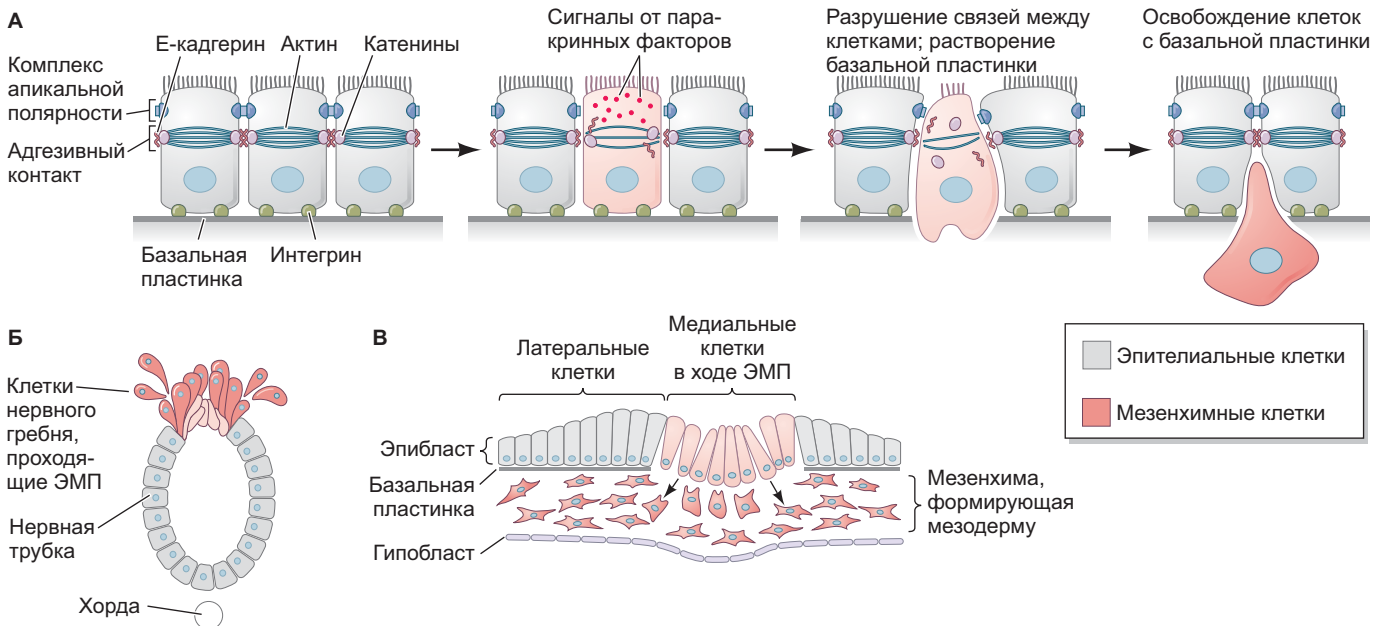


Рис. 4.10. Эпителио-мезенхимный переход, или ЭМП. **А.** Нормальные эпителиальные клетки сцеплены вместе адгезивными контактами, содержащими кадгерин, катенины и кольца актина. Они крепятся к базальной пластинке через интегрины. Паракринные факторы способны подавлять экспрессию генов, кодирующих эти клеточные компоненты, в результате чего клетки теряют полярность, связь с базальной пластинкой и сцепление с другими эпителиальными клетками. Происходит перестройка цитоскелета, а также выделение протеаз, расщепляющих базальную пластинку и другие компоненты межклеточного матрикса базальной мембраны, что позволяет новообразованной мезенхимной клетке мигрировать. **Б, В.** ЭМП можно наблюдать в эмбрионах позвоночных в ходе нормального образования клеток нервного гребня из дорсальной части нервной трубки (**Б**) и во время образования мезодермы мезенхимными клетками, выходящими из эпибласта (**В**)

подавленными, актиновый цитоскелет реорганизуется, а клетки выделяют ферменты, разрушающие базальную пластинку (такие, как металлопротеиназы), и в то же время делятся (Acloque et al., 2009; Kalluri and Weinberg, 2009).

Клеточная сигнализация

Мы только что узнали, как межклеточная адгезия может влиять на положение клетки в эмбрионе, а в предыдущих главах мы обсуждали важность положения клетки в эмбрионе для регуляции ее статуса. Что же такого дает конкретное положение в эмбрионе, что определяет путь развития клетки? Как вы знаете, опыт, полученный в начале жизни, сильно влияет на становление взрослого человека в плане типа личности, выбора профессии, пищевых предпочтений. Схожим образом опыт, который клетка получает, находясь в конкретном месте эмбриона, влияет на становление регуляторных сетей генов, определяющих ее развитие. Поэтому вопрос на самом деле должен звучать так: «Что определяет опыт клетки в конкретном положении?»

Индукция и компетенция

С самых ранних стадий развития и до становления взрослого организма такие аспекты клеточного поведения, как адгезия, миграция, дифференцировка и деление, регулирует передача сигналов от одних клеток другим. Действительно, именно эти взаимодействия (зачастую реципрокные, как будет показано позже) определяют образование органов. Развитие глаза позвоночных служит классическим примером для описания способа организации тканей посредством межклеточных взаимодействий.

В глазах позвоночных свет проходит через прозрачную ткань роговицы и фокусируется тканью хрусталика, в итоге попадая на нейронную сетчатку. Точное расположение тканей глаза не может быть нарушено без ущерба для функции. Координация в построении хрусталика и сетчатки обеспечена коммуникацией между клетками, в ходе которой одна группа клеток передает организующий сигнал другой, меняя ее поведение или траекторию развития. Такой вид взаимодействия известен как **индукция**.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДУКЦИИ И КОМПЕТЕНЦИИ

В каждом индуктивном взаимодействии участвуют по крайней мере два компонента. Первый компонент — **индуктор**, или ткань, которая вырабатывает сигнал (сигналы), меняющий поведение клеток

другой ткани. Часто этот сигнал представлен секретуемым белком, так называемым паракринным фактором. **Паракринные факторы** — это белки, вырабатываемые клеткой или группой клеток и меняющие поведение или дифференцировку соседних клеток (см. рис. 4.1Б). В отличие от эндокринных факторов (гормонов), которые перемещаются с кровью и оказывают свое влияние на удаленные клетки и ткани, выделение паракринных факторов происходит в межклеточное пространство и влияет на соседние клетки. Второй компонент — **реагирующая ткань**, или клетки, которые и подвергаются индукции. Клетки реагирующей ткани должны иметь как рецепторный белок для индуцирующего фактора, так и *способность* реагировать на сигнал. Способность принимать определенный индуктивный сигнал и отвечать на него называют **компетенцией** (Waddington, 1940).

ПОСТРОЕНИЕ ГЛАЗА ПОЗВОНОЧНЫХ

В начале морфогенеза глаза позвоночных парные участки мозга выпячиваются и приближаются к покровной эктодерме головы. Головная эктодерма способна реагировать на паракринные факторы, выделяемые выпячиваниями мозга (глазными пузырями), и, получая их, индуцируется к формированию хрусталика глаза. Хотя определение перспективы клеток хрусталика происходит гораздо раньше, на стадиях нервной пластинки (Grainger, 1992; Ogina et al.,



Рис. 4.11. Компетенция эктодермы и способность отвечать на индуцирующее действие глазного пузыря у *Xenopus*. Глазной пузырь способен индуцировать развитие хрусталика из передней части эктодермы (1), но не в области, которая станет туловищем или брюшком (2). При удалении глазного пузыря эктодерма на поверхности образует аномальный хрусталик или не образует его вовсе (3). Большинство других тканей не способны замечать глазной пузырь (4)

2012), гены дифференцировки хрусталика индуцируются в эктодермных ненейронных клетках головы глазным пузырем (см. гл. 16; Maddala et al., 2008). Кроме того, будущие клетки хрусталика выделяют паракринные факторы, стимулирующие глазной пузырь к формированию сетчатки. Таким образом, две основные части глаза участвуют в формировании друг друга, и глаз создается на основе реципрокных паракринных взаимодействий. Важно, что головная эктодерма — единственная область, способная реагировать на глазной пузырь. Если глазной пузырь зародыша *Xenopus laevis* помещают под эктодерму головы в какой-либо другой области, кроме той, где он обычно находится, он индуцирует эту эктодерму к образованию ткани хрусталика; эктодерма туловища, однако, на глазной пузырь не реагирует (рис. 4.11; Saha et al., 1989; Grainger, 1992).

Часто одна индукция придает ткани способность реагировать на другой индуктор. Исследования на амфибиях показывают, что одним из первых индукторов хрусталика может быть энтодерма передней кишки и сердечная мезодерма, лежащие под хрусталикообразующей эктодермой на стадиях ранней и средней гаструлы (Jacobson, 1963, 1966). Дальнейшие сигналы идут от передней части нервной пластинки, включая сигнал, способствующий синтезу в передней эктодерме транскрипционного фактора Paired box 6 (Pax6), который определяет способность реагировать на сигналы глазного пузыря (рис. 4.12; Zygar et al., 1998). Таким образом, хотя на первый взгляд индуктором хрусталика является

глазной пузырь, до него переднюю эктодерму индуцируют минимум две другие ткани. Ситуация с глазным пузырем напоминает ситуацию с футболистом, забивающим в матче «победный» гол после того, как многие другие игроки помогли привести мяч в отправную точку для его удара.

Глазной пузырь, по-видимому, выделяет два паракринных фактора, одним из которых является BMP4 (Furuta and Hogan, 1998) — белок, поступающий в клетки хрусталика и вызывающий в них выработку транскрипционных факторов Sox (рис. 4.12, панель справа). Другой белок, Fgf8, вызывает выработку транскрипционного фактора L-Maf (Ogino and Yasuda, 1998; Vogel-Hörpker et al., 2000). Как мы видели в гл. 3, комбинация Pax6, Sox2 и L-Maf в эктодерме необходима для формирования хрусталика и активации специфичных для него генов, таких как δ -кристаллин. Pax6 обеспечивает эктодерме способность реагировать на индукторы глазной чашки (Fujiwara et al., 1994). В отсутствие Pax6 как у плодовых мушек, так и у лягушек, крыс и людей глаза неразвиты или сильно редуцированы (Quiring et al., 1994). Эксперименты по рекомбинации поверхностной эктодермы с глазным пузырем из крысиных эмбрионов крыс дикого типа и мутантов по Pax6 показали, что работа Pax6 в поверхностной эктодерме необходима для образования хрусталика (рис. 4.13А, Б). У людей с мутациями Pax6 возникает целый спектр пороков развития глаз. Среди них — аниридия, при которой радужная оболочка уменьшена или отсутствует (рис. 4.13В). У *Xenopus* с мутантным Pax6 выявили

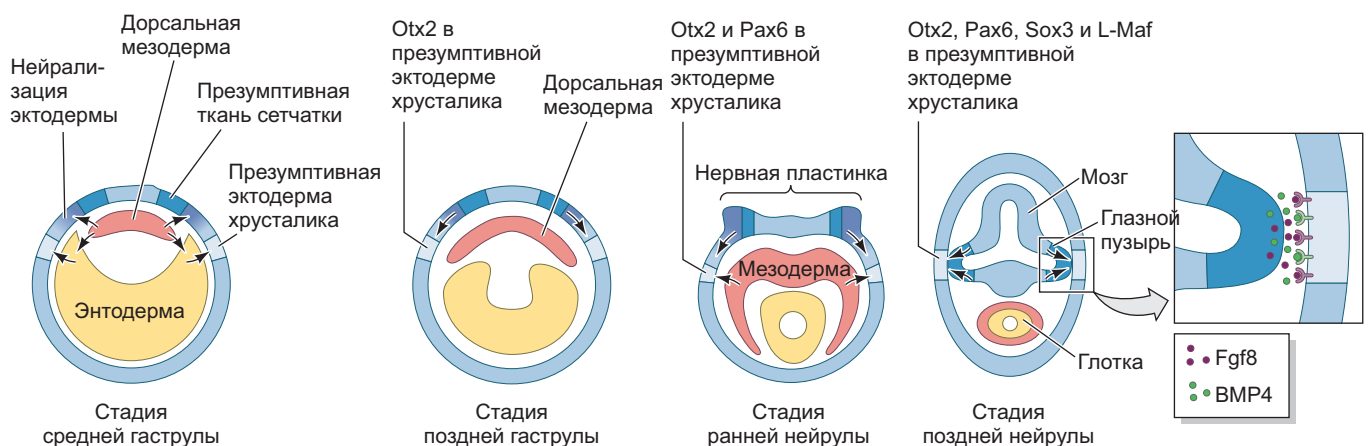


Рис. 4.12. Последовательность индукции хрусталика амфибий, постулированная на основании экспериментов с эмбрионами лягушки *Xenopus laevis*. Неизвестные индукторы (возможно, из энтодермы передней кишки и сердечной мезодермы) вызывают синтез транскрипционного фактора Otx2 в эктодерме головы на стадии поздней гаструлы. По мере подъема нервных валиков индукторы из передней части нервной пластинки (включая область, которая будет образовывать сетчатку) вызывают экспрессию Pax6 в передней эктодерме, способной образовывать ткань хрусталика. Присутствие белка Pax6, возможно, определяет способность поверхностной эктодермы реагировать на глазные пузыри на стадии поздней нейрулы. Глазные пузыри выделяют паракринные факторы семейств BMP и FGF (см. сигналы на вставке с большим увеличением), которые индуцируют синтез факторов транскрипции Sox и запускают наблюдаемое образование хрусталика. (По данным: R. M. Grainger, 1992. *Trends Genet* 8: 349–356.)

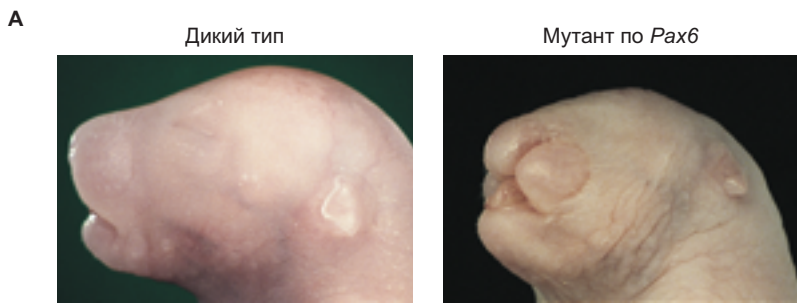
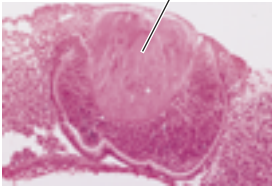
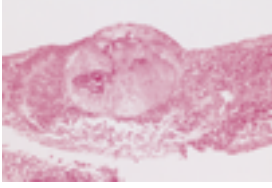
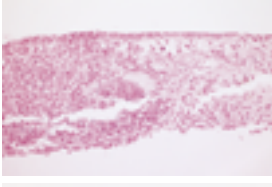


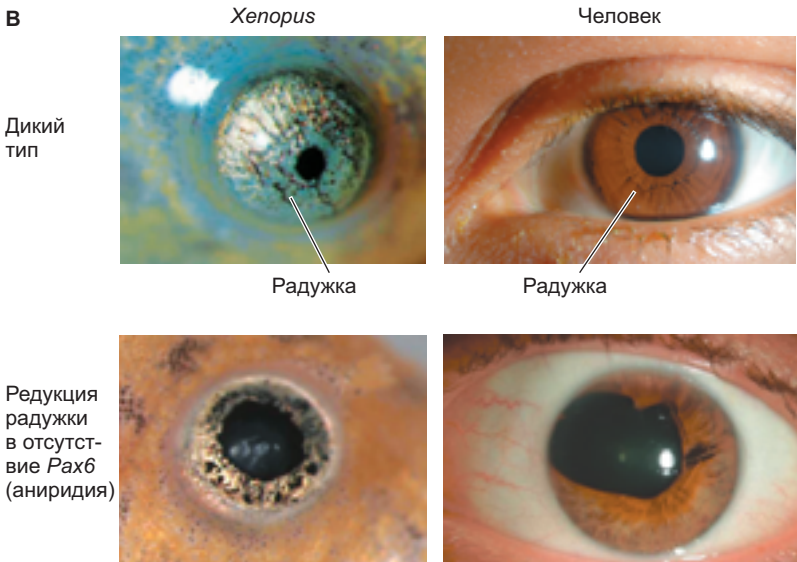
Фото M. Fujiwara

Б

Глазные пузыри	Поверхностная эктодерма	Индукция хрусталика	
Дикий тип	Дикий тип	Да	
<i>Pax6</i> ⁻ / <i>Pax6</i> ⁻	Дикий тип	Да	
Дикий тип	<i>Pax6</i> ⁻ / <i>Pax6</i> ⁻	Нет	
<i>Pax6</i> ⁻ / <i>Pax6</i> ⁻	<i>Pax6</i> ⁻ / <i>Pax6</i> ⁻	Нет	

Из: M. Fujiwara, 1994. *Differentiation* 57: 31–87, с разрешения

Рис. 4.13. Ген *Pax6* одинаково необходим в развитии глаза лягушки, крысы и человека. **А.** Утрата *Pax6* у крыс приводит к отсутствию глаз наряду с существенным недоразвитием носовых структур. **Б.** Анализ индукции хрусталика после экспериментальной рекомбинации глазного пузыря и поверхностной эктодермы между крысиными эмбрионами дикого типа и мутантными с отсутствующим *Pax6*. Для нормального образования хрусталика *Pax6* необходим только в поверхностной эктодерме. **В.** Мутации в гене *Pax6* у *Xenopus* и у людей приводят к схожему недоразвитию радужной оболочки глаза по сравнению с особями дикого типа. Этот фенотип известен как аниридия



По данным: T. Nakayama et al., 2015. *Dev Biol* 408: 328–344, любезно предоставлено R. M. Grainger

Загадки развития

Хотя восстановление лишённых клеток сердца однозначно служит примером перmissive взаимодействия, может ли оно быть обусловлено и инструктивным взаимодействием? Так, полученные из iPSC кардиоваскулярные предшественники успешно заселили децеллюлированное сердце мыши и дифференцировались в кардиомиоциты, гладкие мышцы и эндотелиальные клетки (Lu et al., 2013). Чем именно внеклеточный матрикс обеспечивает клетки-предшественники, непосредственно влияя на их дифференцировку в различные типы клеток?

симптомы, удивительно похожие на симптомы аниридии, что позволило смоделировать и исследовать роль *Pax6* в развитии этого заболевания человека (Nakayama et al., 2015).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ИНСТРУКТИВНЫЕ И ПЕРМИССИВНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

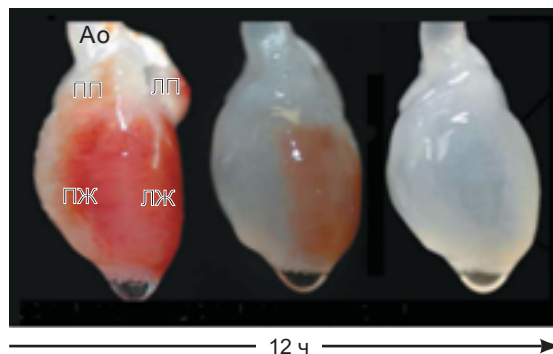
Говард Хольцер (Holtzer, 1968) выделил два основных способа индуктивного взаимодействия. При **инструктивном взаимодействии** сигнал от индуцирующей клетки *необходим* для запуска экспрессии нового гена в отвечающей клетке. Без индуцирующей клетки отвечающая клетка не способна дифференцироваться в определенном направлении. Например, инструктивное взаимодействие, когда глазной пузырь *Xenopus* экспериментально перемещают на новое место под эктодерму головы, что приводит к формированию хрусталика.

Второй тип индуктивного взаимодействия — **перmissive взаимодействие**¹. В этом случае отвечающие ткани уже специализированы и необходимо только окружение, чтобы стала возможной характерная экспрессия. Например, развитие многих тканей зависит от внеклеточного матрикса. Внеклеточный матрикс не меняет тип образующихся клеток, но позволяет проявить заранее детерминированные свойства.

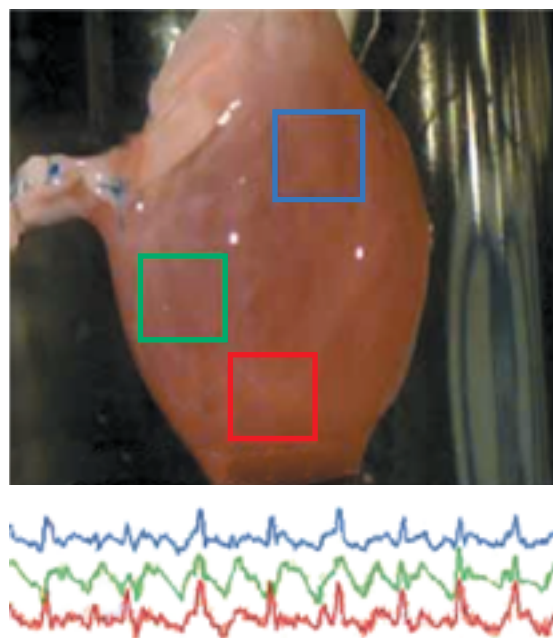
Из регенеративной медицины известен яркий пример перmissive взаимодействия: каркас

¹ Перmissive и инструктивные детерминанты легко различать с помощью аналогии. Этот учебник создан благодаря как перmissive, так и инструктивным взаимодействиям. Рецензент может убедить авторов поменять содержание глав — это инструктивное взаимодействие, так как в ходе него меняется информация, которую доносит читателям книга. В то же время она не могла бы донести эту информацию без перmissive взаимодействий с издателем и типографией.

А Удаление клеток



Б Восстановление клеток



Из: H. C. Ott et al., 2008. *Nat. Med.* 14: 213–221

Рис. 4.14. Восстановление сердца крысы после удаления клеток. **А.** Из цельных сердец мертвых крыс удаляли все клетки путем 12-часовой обработки детергентом SDS. Ход удаления можно наблюдать слева направо. Ao — аорта; ПП — правое предсердие; ЛП — левое предсердие; ПЖ — правый желудочек; ЛЖ — левый желудочек. **Б.** Сердце без клеток устанавливали в биореакторе и заселяли клетками сердечной мышцы новорожденных, которые развивались в самостоятельно сокращающиеся кардиомиоциты, обеспечивающие сокращение полученного конструкта сердца. Записи местных ЭКГ показывают, что соответствующие участки сердца сокращаются синхронно (зеленый, синий, красный квадраты)

из внеклеточного матрикса может способствовать дифференцировке и восстановлению бьющегося сердца. Исследовательская группа Дорис Тейлор использовала детергенты для удаления всех клеток из мертвого сердца крыс, после чего от него оставался только внеклеточный матрикс (рис. 4.14А; Ott et al., 2008). Такие белки как фибронектин,

коллаген и ламинин удерживают вместе остальные компоненты внеклеточного матрикса, сохраняя сложную форму сердца. Затем исследователи заселяли этот каркас из внеклеточного матрикса клетками-предшественниками кардиомиоцитов. Удивительно, но они дифференцировались и организовались в функционально сокращающееся «рецеллюлизированное» сердце (рис. 4.14Б). Таким образом, окружение, создаваемое лишенным клеток внеклеточным матриксом, было снабжено руководством по развитию сердечной мышцы.

Паракринные факторы: молекулы-индукторы

Как происходит передача сигналов между индуктором и отвечающей тканью? При изучении механизмов индукции почечных канальцев и зубов (Grobstein, 1956) было обнаружено, что некоторые индуктивные события могут происходить, несмотря на фильтр, разделяющий эпителиальные и мезенхимные клетки. В то же время другие индукции фильтр блокировал. Поэтому исследователи пришли к выводу, что некоторые из индукторов являются растворимыми молекулами, проходящими через небольшие поры фильтра, а другие индуктивные процессы требуют физического контакта между эпителиальными и мезенхимными клетками (Grobstein, 1956; Saxén et al., 1976; Slavkin and Bringas, 1976).

Взаимодействие мембранных белков на одной клеточной поверхности с рецепторными белками соседних клеточных поверхностей (как в случае с кадгеринами) называют **юкстакринным** (поскольку клеточные мембраны находятся в непосредственной близости, в *юктапозиции*). Когда белки, синтезируемые одной клеткой, диффундируют на расстояние, вызывая изменения в соседних клетках, это событие называют **паракринным взаимодействием**. Паракринные факторы — это диффундирующие молекулы, обычно работающие в радиусе около 15 клеточных диаметров, или 40–200 мкм (Bollenbach et al., 2008; Harvey and Smith, 2009).

Аутокринные взаимодействия тоже возможны; в этом случае клетки, выделяющие паракринные факторы, сами же реагируют на них. Другими словами, клетка синтезирует молекулу, для которой у нее есть собственный рецептор. Хотя аутокринная регуляция не распространена, ее можно наблюдать в клетках цитотрофобласта плаценты; эти клетки синтезируют и секретируют тромбоцитарный фактор роста, рецептор которого находится на клеточной мембране цитотрофобласта (Goustin et al., 1985). В результате происходит взрывная пролиферация этой ткани.

Градиенты морфогенов

Один из важнейших механизмов определения судьбы клеток — регуляция экспрессии генов градиентами паракринных факторов; такие сигнальные молекулы называют морфогенами. **Морфоген** (в пер. с греч. — дающий форму) — это диффундирующая молекула, от концентрации которой зависит путь развития клетки¹. В клетках, подвергающихся воздействию высоких и низких концентраций морфогена, активируются разные гены. Морфогены могут быть транскрипционными факторами, производимыми внутри синцития, как в бластомере *Drosophila* (см. гл. 2). Они также могут быть паракринными факторами, которые вырабатываются одной группой клеток и перемещаются к другой их популяции, задавая клеткам-мишеням одинаковые или разные пути развития в зависимости от концентрации морфогена. В некоммитированных клетках, подвергшихся воздействию высоких концентраций морфогена (ближе всего к источнику его выработки), происходит установление одного клеточного типа. Когда концентрация морфогена падает ниже определенного порога, клеткам указывается другой путь. Если концентрация падает еще ниже, у тех же самых некоммитированных клеток спецификация идет по третьему пути (**рис. 4.15**).

Регуляция на базе градиента концентрации паракринного фактора была изящно продемонстрирована определением различных клеточных типов мезодермы *Xenopus laevis* активинем, паракринным фактором суперсемейства TGFβ (трансформирующий фактор роста-β) (**рис. 4.16**; Green and Smith, 1990; Gurdon et al., 1994). Выделяющие активин гранулы располагали на неспецифицированные клетки ранних эмбрионов *Xenopus*. Далее активин диффундировал из гранул. В высокой концентрации (около 300 молекул на клетку) он вызывал экспрессию гена *goosecoid*, продукт которого является транскрипционным фактором, определяющим дорсальные структуры у лягушек. В более низкой концентрации (около 100 молекул на клетку) активин запускал в той же самой ткани экспрессию гена *Xbra* и мышечную дифференцировку. При еще более низких концентрациях эти гены не активировались и «по умолчанию» в соответствии с профилем экспрессии клетки образовывали кровеносные сосуды и сердце (Dyson and Gurdon, 1998).

Диапазон действия паракринного фактора (и, следовательно, форма морфогенетического градиента) зависит от нескольких аспектов синтеза, транспорта и деградации этого фактора. В некоторых случаях молекулы клеточной поверхности стабилизируют

¹ Хотя налицо некоторая путаница с терминологией, морфоген управляет состоянием клетки количественным образом («больше или меньше»), в то время как морфогенетическая детерминанта задает состояние клетки качественным образом («есть или нет»). Морфогены аналогичные, морфогенетические детерминанты цифровые.

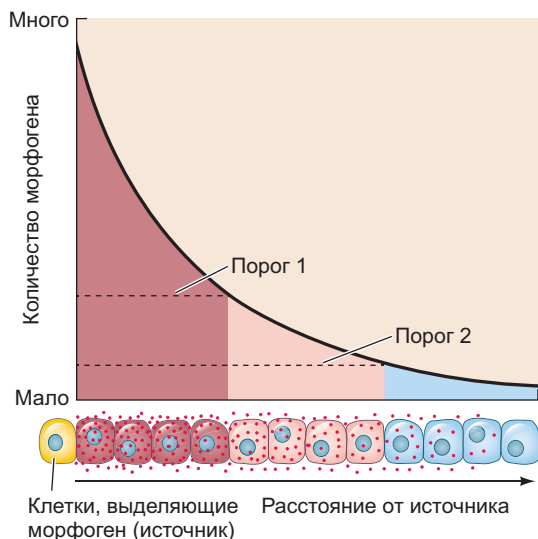


Рис. 4.15. Разделение одинаковых клеток на три клеточных типа за счет градиента морфогена. Морфогенный паракринный фактор (желтые точки) выделяется из клеточного источника (желтый) и образует градиент концентрации в чувствительной к нему ткани. В клетках, оказавшихся в зоне концентрации морфогена выше порога 1 (красный), запускаются определенные гены. В зоне промежуточных концентраций (между порогами 1 и 2, розовый) в клетках активируется другой набор генов, а также ингибируются гены, активные при более высокой концентрации морфогена. В клетках, на которые действуют низкие концентрации морфогена (ниже порога 2, синий), активируется третий набор генов. (По данным: K.W. Rogers and A. F. Schier, 2011. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 377–407. Из: A. Kicheva and M. González-Gaitán, 2008. *Curr Opin Cell Biol* 20: 137–143.)

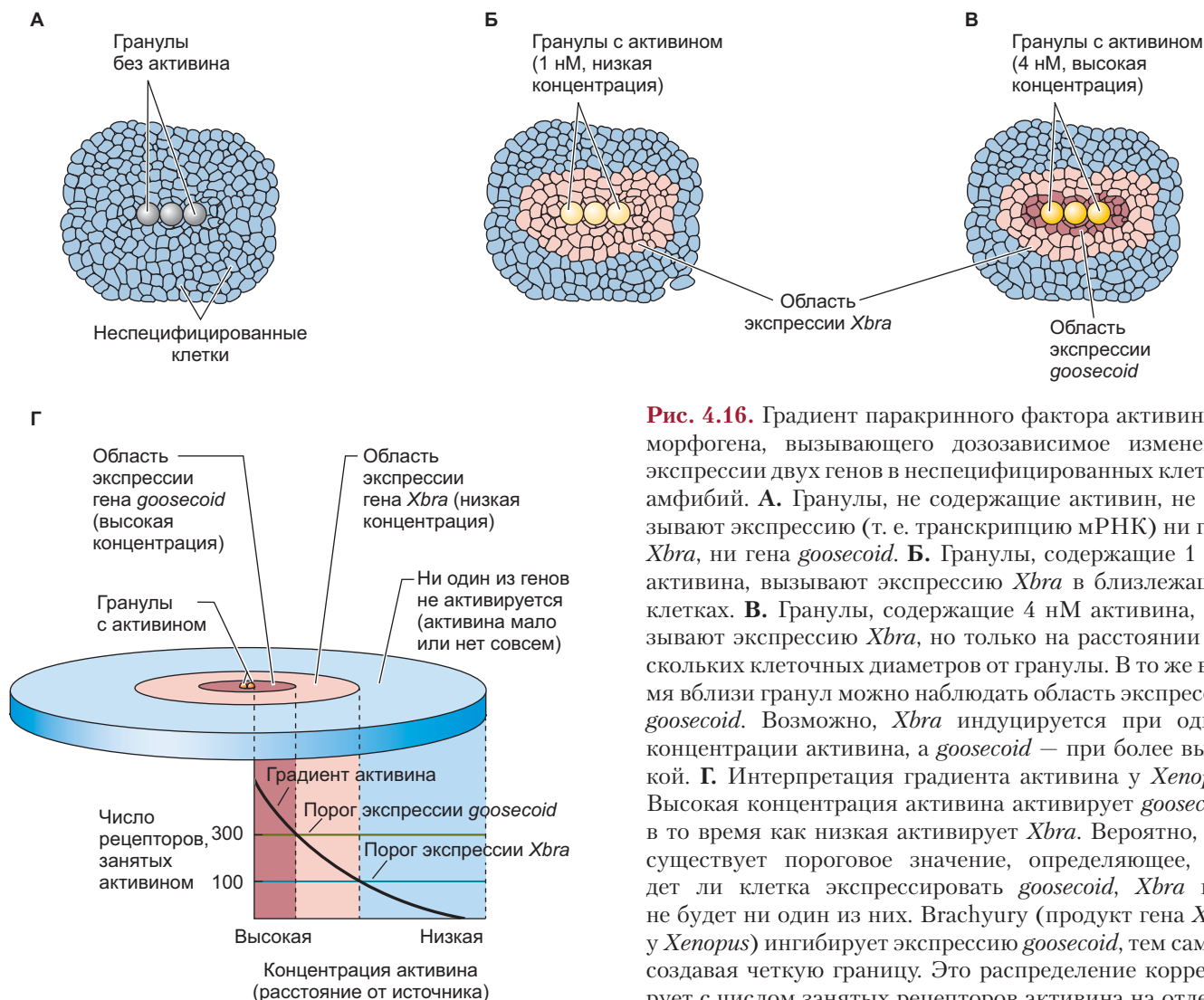


Рис. 4.16. Градиент паракринного фактора активина — морфогена, вызывающего дозозависимое изменение экспрессии двух генов в неспецифицированных клетках амфибий. **А.** Гранулы, не содержащие активин, не вызывают экспрессию (т. е. транскрипцию мРНК) ни гена *Xbra*, ни гена *goosecoid*. **Б.** Гранулы, содержащие 1 нМ активина, вызывают экспрессию *Xbra* в близлежащих клетках. **В.** Гранулы, содержащие 4 нМ активина, вызывают экспрессию *Xbra*, но только на расстоянии нескольких клеточных диаметров от гранулы. В то же время вблизи гранул можно наблюдать область экспрессии *goosecoid*. Возможно, *Xbra* индуцируется при одной концентрации активина, а *goosecoid* — при более высокой. **Г.** Интерпретация градиента активина у *Xenopus*. Высокая концентрация активина активирует *goosecoid*, в то время как низкая активирует *Xbra*. Вероятно, что существует пороговое значение, определяющее, будет ли клетка экспрессировать *goosecoid*, *Xbra* или не будет ни один из них. *Brachyury* (продукт гена *Xbra* у *Xenopus*) ингибирует экспрессию *goosecoid*, тем самым создавая четкую границу. Это распределение коррелирует с числом занятых рецепторов активина на отдельных клетках. (По данным: J. B. Gurdon et al., 1994. *Nature* 371: 487–492 и J. B. Gurdon et al., 1998. *Cell* 95: 159–162.)

паракринный фактор и способствуют его диффузии, а в других случаях часть клеточной поверхности может замедлить диффузию и усилить деградацию. Такие регулирующие диффузию взаимодействия между морфогенами и факторами внеклеточного матрикса очень важны для координации роста и формы органов (Ben Zvi and Barkai, 2010; Ben Zvi et al., 2011).

СЕМЕЙСТВА ПАРАКРИННЫХ ФАКТОРОВ

Индукция множества органов происходит благодаря относительно небольшому набору паракринных факторов, зачастую действующих как морфогены. Эмбрион наследует довольно компактный генный «инструментарий» и использует для построения сердца, почек, зубов, глаз и других органов наборы с множеством одинаковых генов. Более того, представители всего царства животных используют одни и те же белки; к примеру, факторы, участвующие в создании глаза или сердца *Drosophila* очень похожи на те, что создают эти органы у млекопитающих. Многие паракринные факторы на основании их структуры можно отнести к одному из четырех основных семейств:

- 1) семейству фактора роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF);
- 2) семейству Hedgehog;
- 3) семейству Wnt;
- 4) суперсемейству TGF β , включающему семейства TGF β , активина, морфогенетических белков кости (bone morphogenetic proteins, BMP), белков Nodal, семейству Vg1 и некоторых других связанных с ними белков.

Каскады передачи сигнала: ответ на индукторы

Для того чтобы лиганд вызвал клеточный ответ, он должен связаться с рецептором, который запускает в клетке каскад событий, в итоге регулирующий этот ответ. Этот процесс называют **каскадом передачи сигнала**. Паракринные факторы функционируют, связываясь с рецептором, запускающим в клетке ряд ферментативных реакций. Конечной целью ферментативных реакций является регуляция либо транскрипционных факторов, либо цитоскелета, что приводит к изменению экспрессии генов либо формы и движения клетки соответственно.

Все основные пути передачи сигнала, по-видимому, вариации одной и той же схемы (**рис. 4.17**). Каждый рецептор пронизывает клеточную мембрану и имеет внеклеточный, трансмембранный и цитоплазматический участки. Связываясь с внеклеточным доменом своего рецептора, паракринный фактор вызывает конформационное изменение его структуры. Изменение передается через мембрану на цитоплазматический домен рецептора, придавая

ему способность активировать цитоплазматические белки. Нередко конформационное изменение придает домену ферментативную активность, чаще всего киназную, т. е. способность фосфорилировать специфичные остатки тирозина определенных белков с использованием АТФ. Рецепторы такого типа часто называют **тирозинкиназными рецепторами** (ТКР). Активированный рецептор может катализировать реакции фосфорилирования других белков, что в свою очередь запускает их активность. В конце концов, **каскад** фосфорилирования активирует «дремлющий» фактор транскрипции или набор белков цитоскелета.

Ниже мы опишем ряд основных характеристик четырех семейств паракринных факторов, способы их секреции, установление их градиентов и механизмы, лежащие в основе трансдукции сигнала в чувствительных клетках. По мере ознакомления в следующих частях этой книги с ролью указанных путей в различных событиях развития, возвращайтесь к этой главе, чтобы освежить в памяти механизмы, вовлеченные в данные процессы.

Факторы роста фибробластов и тирозинкиназный сигнальный путь

Семейство паракринных **факторов роста фибробластов** (fibroblast growth factor, FGF) включает около 24 структурно близких членов, а гены FGF посредством альтернативного сплайсинга РНК и изменения точки начала транскрипции в различных тканях

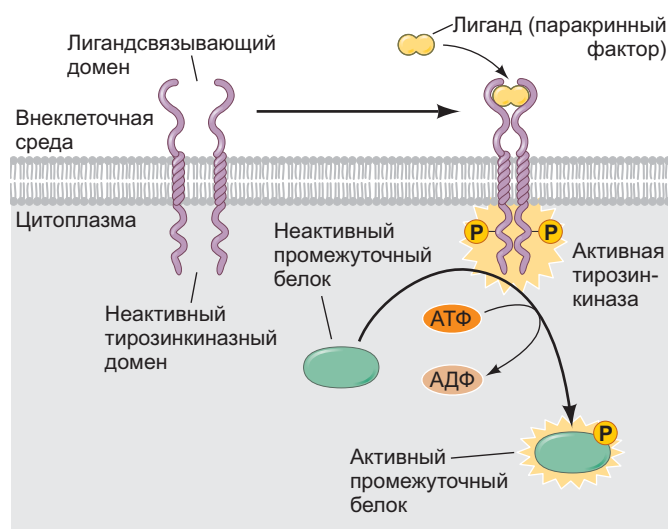


Рис. 4.17. Структура и функции тирозинкиназного рецептора. Связывание паракринного фактора (такого как Fgf8) внеклеточным участком рецепторного белка активирует неактивную тирозинкиназу; ее ферментативная активность направлена сначала на фосфорилирование парного домена в димере рецептора, а затем — некоторых внутриклеточных белков по определенным тирозиновым остаткам

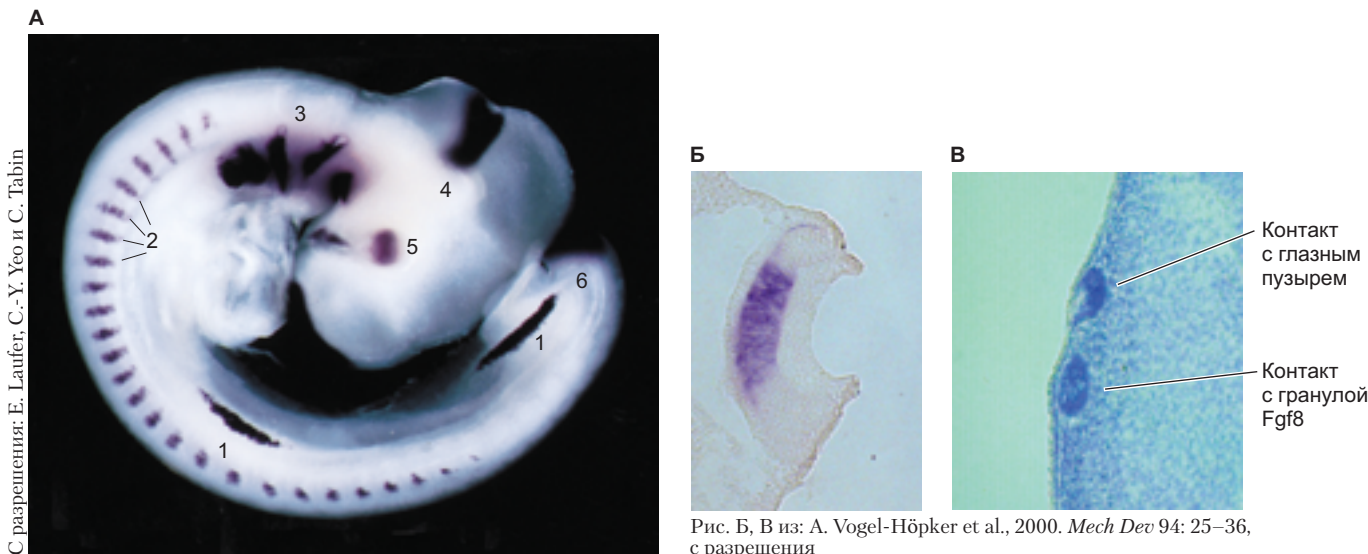


Рис. Б, В из: A. Vogel-Hörpker et al., 2000. *Mech Dev* 94: 25–36, с разрешения

Рис. 4.18. Fgf8 в развитии цыпленка. **А.** Характер экспрессии гена *Fgf8* у трехдневного куриного эмбриона, показанный с помощью гибридизации *in situ*. Белок Fgf8 (темные области) виден в дистальной части эктодермы почки конечности (1), в мезодерме сомитов (сегменты из блоков клеток вдоль передне-задней оси, (2), в жаберных дугах шеи (3), на границе между средним и задним мозгом (4), в глазном пузыре развивающегося глаза (5) и в хвосте (6). **Б.** Гибридизация *in situ* *Fgf8* в глазном пузыре. мРНК *Fgf8* (фиолетовый) локализуется в презумптивной сетчатке глазной чаши и находится в непосредственном контакте с клетками покровной эктодермы, которая станет хрусталиком. **В.** Эктопическая экспрессия *L-Maf* в компетентной эктодерме может быть вызвана и глазным пузырем (сверху), и Fgf8-содержащей гранулой (внизу)

синтезируют сотни белковых изоформ (Larpi, 1995). Белок Fgf1, известный также как кислый FGF, по-видимому, участвует в регенерации (Yang et al., 2005); Fgf2 иногда называют основным FGF, и он чрезвычайно важен для образования сосудов; фактор роста кератиноцитов Fgf7 имеет решающее значение для развития кожи. Хотя белки FGF часто взаимозаменяемы, распределение их экспрессии и соответствующих рецепторов придает им различные функции.

FGF8

Этот член семейства FGF важен для множества различных процессов эмбриогенеза, включая сегментацию, развитие конечностей и индукцию хрусталика. Fgf8 синтезируется глазным пузырем при контакте с покровной эктодермой головы (рис. 4.18А; Vogel-Hörpker et al., 2000). Контакт побуждает покровную эктодерму к образованию хрусталика, после чего экспрессия гена *Fgf8* концентрируется в области презумптивной нейральной сетчатки (находящейся в непосредственном контакте с презумптивным хрусталиком) (рис. 4.18Б). Путем размещения Fgf8-содержащих гранул вплотную к эктодерме головы¹

было показано, что присутствия Fgf8 достаточно для индукции образования хрусталика; эктопический Fgf8 побуждает эктодерму экспрессировать фактор транскрипции хрусталика L-Maf и формировать эктопические хрусталики (рис. 4.18В). FGF обычно действуют, активируя набор тирозинкиназных рецепторов, называемых **рецепторами фактора роста фибробластов** (fibroblast growth factor receptors, FGFR).

Когда (и только тогда) FGFR связывает лиганд FGF, неактивная киназная часть рецептора активируется и фосфорилирует сначала своего «партнера» в димере FGFR, а затем другие ассоциированные белки в отвечающей клетке. Белки после активации могут выполнять новые функции. Путь ТКР (рис. 4.19) был одним из первых путей передачи сигнала, который объединил биологию развития, поскольку исследователи, изучающие глаз *Drosophila*, вульву нематод и опухоли у человека, обнаружили, что занимаются одними и теми же генами!

FGF и сигнальный путь JAK-STAT

Факторы роста фибробластов могут также активировать каскад JAK-STAT. Этот путь чрезвычайно важен для дифференцировки клеток крови, роста конечностей, активации гена казеина при выработке молока (рис. 4.20; Briscoe et al., 1994; Groner and Gouilleux, 1995). Каскад взаимодействий запускается, когда паракринный фактор связывается с внеклеточным

¹ Синтетические гранулы можно покрыть белками и разместить на тканях эмбриона. Белки медленно высвобождаются из гранулы и диффундируют вокруг, создавая градиент концентрации.

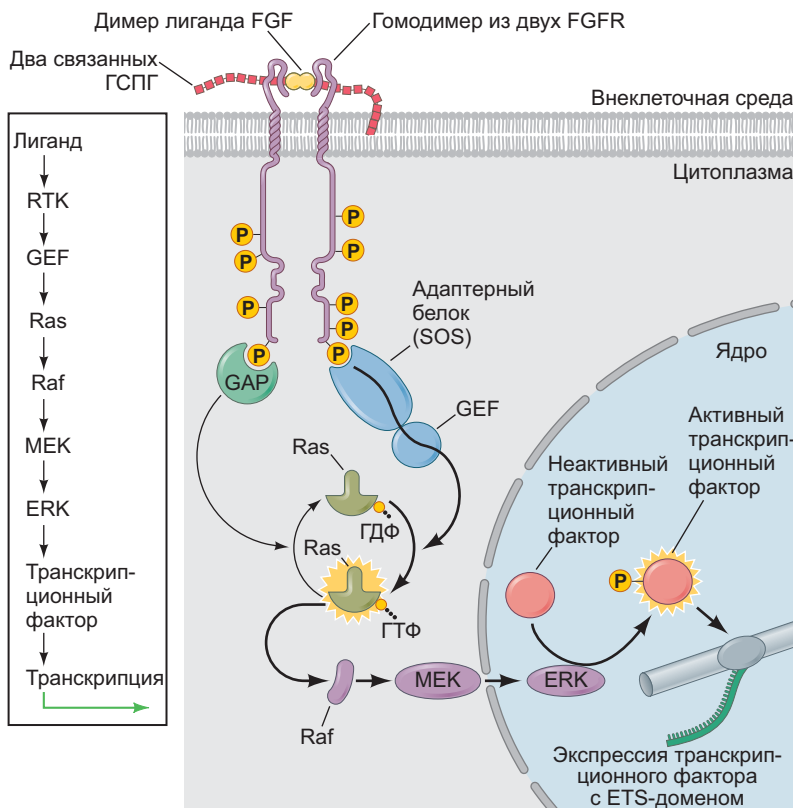


Рис. 4.19. Широко используемый тирозинкиназный путь передачи сигнала может быть активирован фактором роста фибробластов. Лиганд (паракринный фактор, например, FGF) и гепарансульфатпротеогликаны (ГСПГ) вместе вызывают димеризацию и аутофосфорилирование РТК. Адаптерный белок распознает фосфорилированные тирозины в РТК и активирует промежуточный белок GEF, который активирует белок RasG, делая возможным фосфорилирование связанного с ГДФ Ras. В то же время белок GAP стимулирует гидролиз фосфоэфирной связи, возвращая Ras в неактивное состояние. Ras активирует серинтреониновую протеинкиназу Raf, которая в свою очередь фосфорилирует серию киназ (таких как MEK). В итоге активированная ERK киназа меняет экспрессию генов в ядре отвечающей клетки, фосфорилируя определенные факторы транскрипции (которые после этого могут входить в ядро и менять набор транскрибируемых генов) и трансляции (меняют уровень синтеза белка). Во многих случаях этот сигнальный путь регулирует экспрессию гена транскрипционного фактора с ETS-доменом (E26 transformation-specific). Слева представлена упрощенная версия сигнального пути

доменом трансмембранного рецептора, цитоплазматический домен которого связан с белками **JAK** (Janus-киназы). Связывание паракринного фактора с рецептором активирует JAK-киназы, а они фосфорилируют белки из семейства транскрипционных факторов **STAT** (signal transducers and activators of transcription) (Ihle, 1996, 2001). Фосфорилированный транскрипционный фактор STAT затем может проходить в ядро и взаимодействовать с энхансерами.

Семейство Hedgehog

Белки семейства паракринных факторов **Hedgehog** — это многофункциональные сигнальные белки, которые действуют в эмбрионе путем передачи сигнала, участвуя в определении клеточного типа, либо другими способами влияя на клетки. Исходно *hedgehog* был обнаружен у *Drosophila*, гены которой называют по мутантным фенотипам: мутации с потерей функции *hedgehog* (в пер. с англ. — еж) приводит к тому, что личинка покрывается острыми зубчиками кутикулы (волосообразными структурами) и напоминает ежа. У позвоночных присутствует как минимум три гомолога гена *Drosophila hedgehog*: *sonic hedgehog* (*shh*), *desert hedgehog* (*dhh*) и *indian hedgehog* (*ihh*). Белок Desert hedgehog обнаруживают в клетках Сертоли в семеннике и у мышей, гомозиготных по нулевому аллелю *Dhh*, нарушен спермато-

генез. Indian hedgehog экспрессируется в кишечнике и хряще, важен для роста костей после рождения (Bitgood and McMahon, 1995; Bitgood et al., 1996). Из этих трех гомологов у *Sonic hedgehog*¹ больше всего функций. Помимо прочего, *Sonic hedgehog* отвечает за выход двигательных (моторных) нейронов из вентральной части нервной трубки (см. гл. 13); за образование позвонка из части каждого сомита (см. гл. 17); за развитие перьев курицы в правильных местах; за правильную ориентацию пальцев, с мизинцем в самом заднем положении (см. гл. 19). Сигналы Hedgehog способны регулировать множество событий в развитии благодаря тому, что белки Hedgehog работают как морфогены; они выделяются из клеточного источника, формируют градиент в пространстве и вызывают дифференциальную экспрессию генов в зависимости от концентрации, приводя к образованию различных клеточных типов.

¹ Да, его назвали в честь персонажа Sega Genesis. Риддл и коллеги (1993) обнаружили три гомолога гена *hedgehog* *Drosophila*. Два назвали в честь существующих видов ежей, а третий — в честь анимированного. Еще два гена *hedgehog*, присутствующие только у рыб, изначально называли *echidna hedgehog* (возможно, в честь друга Соника) и *tiggywinkle hedgehog* (в честь выдуманного ежа из сказки Беатрис Поттер), но сейчас их обозначают соответственно *ihh-b* и *shh-b*.

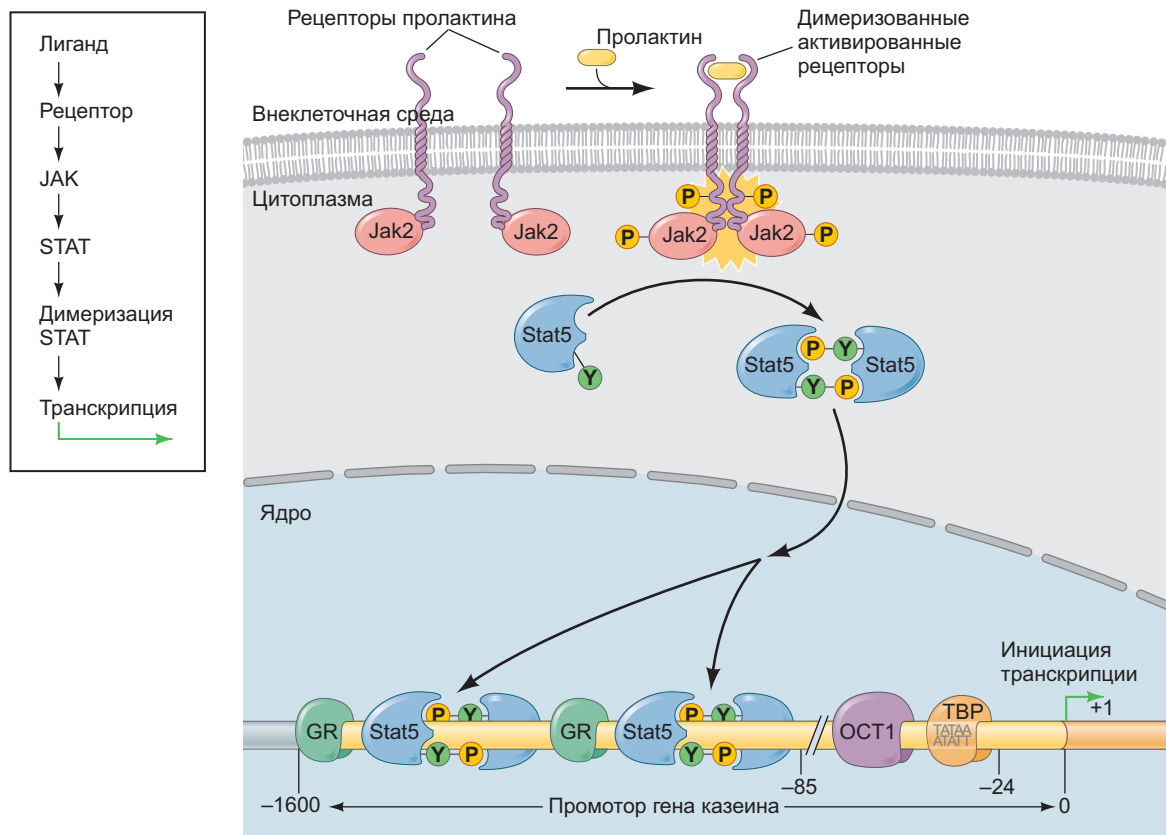


Рис. 4.20. Сигнальный путь JAK-STAT: активация гена *casein*. Ген казеина активируется в ходе последней (лактогенной) фазы развития молочной железы млекопитающих, а активирующим сигналом выступает выделение гормона пролактина из передней доли гипофиза. Пролактин вызывает димеризацию пролактиновых рецепторов на эпителиальных клетках млечных протоков. Цитоплазматический домен этих рецепторов сцеплен с определенным JAK-белком (Jak2). Когда рецепторы связывают пролактин и димеризуются, JAK-белки фосфорилируют друг друга и димеризованные рецепторы, активируя их «дремлющую» киназную активность. Активированные рецепторы добавляют фосфатную группу к тирозиновым остаткам (Y) определенного белка STAT, в данном случае Stat5. Это позволяет Stat5 димеризоваться, перемещаться в ядро и связываться с определенными участками ДНК. В комбинации с другими транскрипционными факторами (находящимися на месте «в ожидании» его прибытия), белок Stat5 активирует транскрипцию гена *casein*. GR — рецептор глюкокортикоидов, OCT1 — общий транскрипционный фактор, а TBP является основным промоторсвязывающим белком, отвечающим за присоединение РНК-полимеразы II (см. гл. 3). Слева представлена упрощенная схема. (По данным: B. Groner and F. Gouilleux, 1995. *Curr Opin Genet Dev* 5: 587–594.)

СЕКРЕЦИЯ HEDGEHOG

Различные способы процессинга и сборки белков Hedgehog могут существенно влиять на количество выделяемого белка и образуемый градиент (рис. 4.21). При отщеплении карбоксильного конца и связывании с остатками холестерина и пальмитиновой кислоты белок Hedgehog может выделяться в виде мономеров или мультимеров, липопротеиновых комплексов и даже в составе экзосом.

Было показано, что в почке конечности мыши Shh, не модифицированный холестерином, диффундирует слишком быстро и рассеивается в окружающем пространстве (Li et al., 2006). Такие липидные модификации необходимы для устойчивости градиентов

концентрации и активации сигнального пути. С помощью различных механизмов процессинга и транспорта белков стабильные градиенты Hedgehog могут сохраняться на расстояниях в несколько сотен микрон (например, порядка 30 клеточных диаметров в случае с конечностью мыши).

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ HEDGEHOG

Остаток холестерина на Hedgehog важен не только для регуляции его транспорта из клетки; он также необходим, чтобы Hedgehog мог связаться со своим рецептором на мембране отвечающей клетки (Grover et al., 2011). Связывающий Hedgehog рецептор назы-

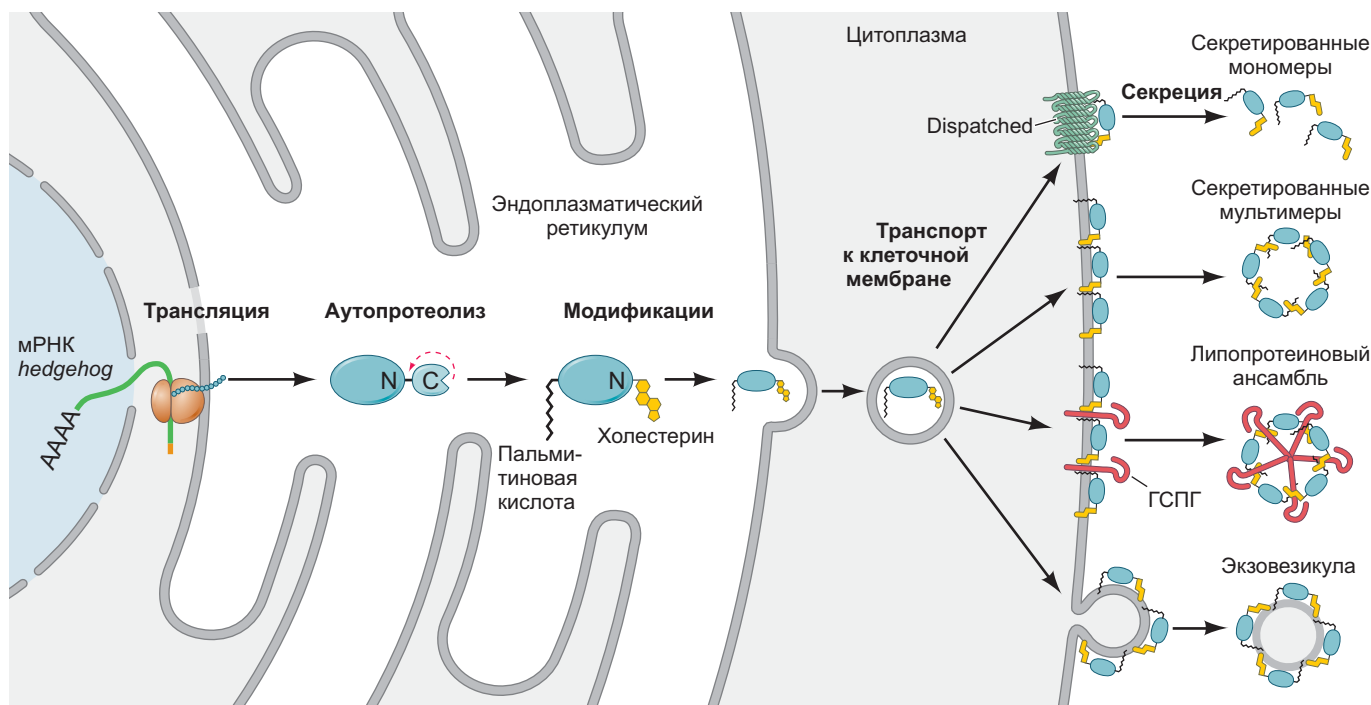


Рис. 4.21. Процессинг и выделение Hedgehog. В результате трансляции с мРНК гена *hedgehog* в эндоплазматическом ретикулуме образуется белок Hedgehog с аутопротеолитической активностью, которая отщепляет карбоксильный конец (C) и обнажает сигнальную последовательность, маркирующую белки для секреции. Освободившийся C-концевой участок не нужен для проведения сигнала и деградирует, в то время как участок с amino-конца (N) молекулы становится активной формой белка Hedgehog, предназначенной для секреции. Секреция требует присоединения к белку Hedgehog холестерина и пальмитиновой кислоты (Briscoe and Thérond, 2013). Холестериновый остаток взаимодействует с трансмембранным белком под названием Dispatched, обеспечивая секрецию и диффузию Hedgehog в виде мономеров; для образования мультимеров требуются и холестерин, и пальмитиновая кислота. Кроме того, взаимодействие Hedgehog с гепарансульфатсодержащими мембранными протеогликами (ГСПГ) способствует сборке и секреции молекул Hedgehog в виде липопротеиновых ансамблей (Breitling, 2007; Guerrero and Chiang, 2007). Схожим образом Hedgehog может кластеризоваться и транспортироваться из клетки в составе экзосом.

вают Patched, это большой белок, проходящий через мембрану 12 раз (рис. 4.22). Как ни удивительно, но Patched не передает сигнал. Скорее, он подавляет работу другого трансмембранного рецептора под названием Smoothened.

В отсутствие связанного с Hedgehog белка Patched Smoothened не активен и деградирует, а транскрипционный фактор *Cubitus interruptus* (Ci) у *Drosophila* или один из его гомологов у позвоночных (Gli1, Gli2, или Gli3) закреплен на микротрубочках клетки. Несмотря на связь с микротрубочками, Ci/Gli расщепляется таким образом, что часть его попадает в ядро и действует как репрессор транскрипции. Реакцию расщепления катализирует несколько белков, включая Fused, супрессор Fused (suppressor of fused, SuFu) и протеинкиназу A (PKA).

В присутствии Hedgehog в отвечающей клетке экспрессируется несколько дополнительных корецепторов (Ihog/Cdo, Voi/Voc и Gas1), которые совместно помогают взаимодействию Hedgehog-

Patched. После связывания форма белка Patched меняется таким образом, что он перестает ингибировать Smoothened и сам вступает на путь эндоцитоза для деградации. Smoothened освобождает Ci/Gli от микротрубочек (предположительно, путем фосфорилирования), и полноценный белок Ci/Gli получает возможность проходить в ядро и действовать как активатор транскрипции тех же генов, которые репрессировал в расщепленном виде (см. рис. 4.22; Lum and Beachy, 2004; Briscoe and Thérond, 2013; Yao and Chuang, 2015).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

РАЗНООБРАЗИЕ СПОСОБНОСТЕЙ SONIC HEDGEHOG

Сигнальный путь Hedgehog чрезвычайно важен: помимо прочих процессов, он участвует в разметке конечностей у позвоночных, дифференцировке

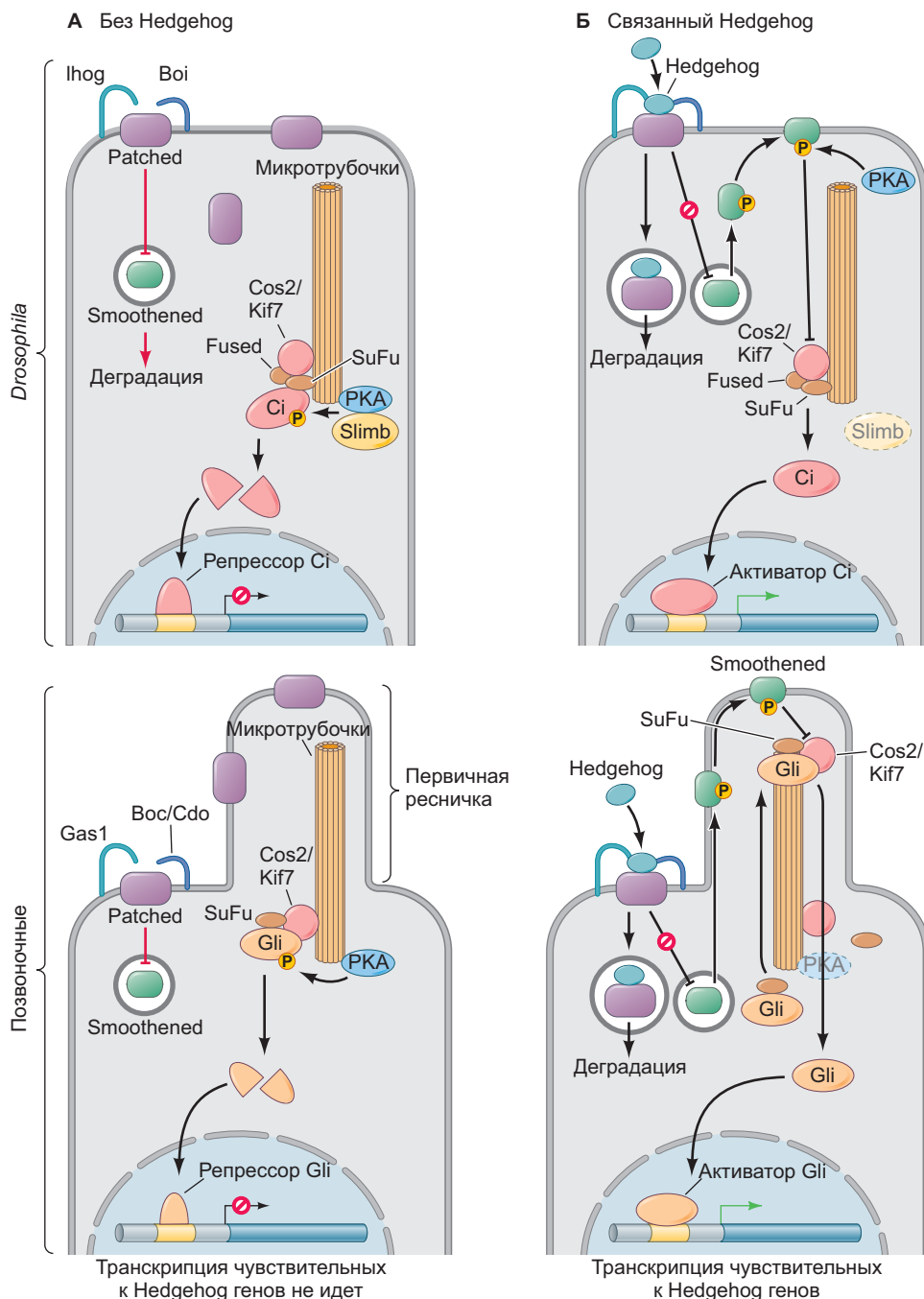


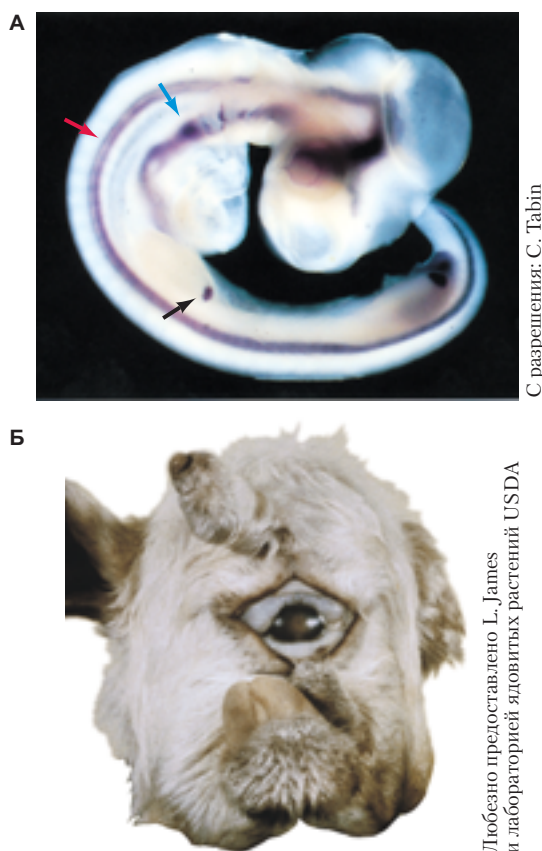
Рис. 4.22. Путь передачи сигнала Hedgehog. Мембранный белок Patched является ингибитором белка Smoothened. **А.** В отсутствие связанного Hedgehog, Patched служит Smoothened, и белок *Drosophila melanogaster* Ci остается закрепленным на микротрубочках белками Cos2 и Fused. Это связывание позволяет белкам PKA и Slimb отщеплять от Ci репрессор транскрипции, подавляющий экспрессию определенных генов. **Б.** Когда Hedgehog связывается с Patched, конформационные изменения приводят к отмене ингибирования белка Smoothened. Затем Smoothened освобождает Ci от микротрубочек, инактивируя расщепляющие его белки PKA и Slimb. Белок Ci проходит в ядро и действует как активатор транскрипции определенных генов. У позвоночных (нижние панели) гомологами Ci являются белки Gli, которые схожим образом работают репрессорами или активаторами транскрипции в случае, соответственно, отсутствия или присутствия связанного с Patched лиганда Hedgehog. Для того чтобы простимулировать переход Gli в форму активатора, у позвоночных Smoothened должен еще получить доступ в выступ клетки, называемый первичной ресничкой (см. рис. 4.33), — его открывает связывание лиганда Hedgehog с Patched. Наконец, передачу сигнала Hedgehog усиливают некоторые корецепторы, такие как Gas1 и Boc. (По данным: R. L. Johnson and M. P. Scott, 1998. *Curr Opin Genet Dev* 8: 450–456; J. Briscoe and P. P. Théron, 2013. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 416–429; E. Yao and P. T. Chuang, 2015. *J Formos Med Assoc* 114: 569–576.)

нейронов, развитии сетчатки и поджелудочной железы, морфогенезе черепа (рис. 4.23А; McMahon et al., 2003). У мышей, гомозиготных по мутантной аллели *Sonic hedgehog*, наблюдали серьезные аномалии конечностей и лицевой части черепа. Структуры средней линии лица были значительно редуцированы, а посередине лба образовывался единственный глаз — состояние, названное циклопией в честь одноглазого циклопа из «Одиссеи» Гомера (рис. 4.23Б; Chiang et al., 1996). У людей некоторые синдромы циклопии бывают вызваны мутациями в генах, кодирующих сам *Sonic hedgehog* или ферменты синтеза холестерина (Kelley et al., 1996; Roessler et al., 1996; Opitz and Furtado, 2012). Более того, химические агенты, вызывающие циклопию, делают это именно через вмешательство в сигнальный путь *Hedgehog* (Beachy et al., 1997; Cooper et al., 1998). Известны

два тератогена, вызывающие циклопию у позвоночных, — джервин и циклопамин¹. Оба являются алкалоидами растения *Veratrum californicum* (черемерица калифорнийская) и напрямую связываются со *Smoothened*, ингибируя его функции (см. рис. 4.23Б; Keeler and Binns, 1968).

Существуют и другие мишени для передачи сигналов *Hedgehog*, не зависящие от факторов транскрипции *Gli*, и эти неканонические сигнальные пути *Hedgehog* способны вызывать быструю перестройку актинового цитоскелета с целью вызвать направленную миграцию клеток. В лаборатории Charron было показано, что градиент *Sonic hedgehog*, исходящий от дна нервной трубки, может быть опознан аксонами и использован для их наведения: привлекаемые им аксоны комиссуральных нейронов поворачивают в сторону средней линии и переходят в другое полушарие мозга (см. гл. 15; Yam et al., 2009; Sloan et al., 2015).

В позднем развитии *Sonic hedgehog* участвует для образования перьев у куриного эмбриона, волос у млекопитающих, а в случае ошибок регуляции — рака кожи человека (Harris et al., 2002; Michino et al., 2003). Хотя мутации, инактивирующие сигнальный путь *Hedgehog*, могут вызывать уродства, мутации, эктопически активирующие его, способны проявлять митогенный эффект и вызывать рак. Если в соматических тканях присутствует мутантный белок *Patched*, не способный ингибировать *Smoothened*, из клеток базального слоя эпидермиса развиваются опухоли (базальноклеточные карциномы). Наследуемые мутации гена *PATCHED* вызывают синдром злокачественного базальноклеточного невуса, редкое аутосомно-доминантное состояние, характеризующееся аномалиями развития (сращение пальцев, аномалии ребер и лица) и многочисленными злокачественными опухолями (Hahn et al., 1996; Johnson et al., 1996). Интересно, что препарат Висмодегиб, ингибирующий функцию *Smoothened* тем же способом, что и циклопамин, в настоящее время проходит клинические испытания в качестве терапии базальноклеточной карциномы (Dreno et al., 2014; Erdem et al., 2015). (Как вы думаете, какие предупреждения о применении при беременности должны быть для этого препарата?)



С разрешения: С. Tabin

Любезно предоставлено L. James и лабораторией ядовитых растений USDA

Рис. 4.23. А. С помощью гибридизации *in situ* показана экспрессия *Sonic hedgehog* в нервной системе (красная стрелка), кишечнике (синяя стрелка) и почке конечности (черная стрелка) трехдневного куриного эмбриона. Б. Голова ягненка с циклопией, рожденного у овцы, которая в начале беременности поела растение *Veratrum californicum*. Полушария мозга сливаются, что приводит к образованию единственного глаза по центру головы и отсутствию гипофиза. Алкалоид джервин, производимый этим растением, ингибирует синтез холестерина, необходимого для производства и рецепции *Hedgehog*

Семейство Wnt

Паракринные факторы Wnt — крупное семейство богатых цистеином гликопротеинов, как минимум 11 консервативных членов семейства функционируют у позвоночных (Nusse and Varmus, 2012); у че-

¹ Тератогенами называют внешние агенты, способные вызывать пороки эмбрионального развития; см. гл. 1 и 23.

ловека найдено 19 отдельных генов *Wnt*⁴¹. Семейство Wnt было впервые открыто и названо *wingless* в 1980 г. в ходе прямого генетического скрининга у *Drosophila melanogaster*, проводимого К. Нюсслейн-Вольхард и Э. Вейсхаусом. Как вы уже могли догадаться, мутации в этом локусе предотвращают образование крыла. Название Wnt получили слиянием названия гена полярности сегментов *wingless* у *Drosophila* с названием *integrated* одного из его гомологов у позвоночных. Огромный набор генов *Wnt* у разных видов говорит об их участии в столь же большом числе событий в ходе развития. Например, белки Wnt необходимы для установления полярности конечностей насекомых и позвоночных, пролиферации стволовых клеток, регуляции клеточной судьбы в различных тканях в соответствии с положением по осям, для развития мочеполовой системы млекопитающих (рис. 4.24) и для направления миграции мезенхимных клеток и аксонов. О том, насколько широко задействовано семейство Wnt во всем на свете, красноречивее всего говорит его эволюционный возраст: было обнаружено, что гены, родственные *wnt*, присутствовали уже у самых древних многоклеточных животных (см. гл. 24). Каким же образом сигналы Wnt оказываются способными участвовать в таких разнообразных процессах, как определение пути развития и деление клеток?

СЕКРЕЦИЯ WNT: ПРЕПРОЦЕССИНГ

Как в случае построения функциональных Hedgehog-белков, Wnt синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме и модифицируются путем добавления липидов (пальмитиновой и пальмолеиновой кислот). Эти липидные модификации катализирует *O*-ацетилтрансфераза *Porcupine* («дикообраз»). (Как вы думаете, почему этот фермент так назвали?) Интересно, что потеря гена *Porcupine* приводит к сниженной секреции Wnt одновременно с его накоплением в эндоплазматическом ретикулуме (van den Heuvel et al., 1993; Kadowaki et al., 1996), таким образом присоединение липидов к Wnt важно для его транспорта к клеточной мембране. Оказавшись у мембраны, Wnt секретируется теми же механизмами, которые мы рассматривали для белка Hedgehog: свободной диффузией, транспортом в составе экзосом,



С разрешения: J. Peraasari и S. Vainio

Рис. 4.24. Wnt4 необходим для развития почек и определения пола по женскому типу. **А.** Мочеполовая система новорожденной самки мыши дикого типа. **Б.** Мочеполовая система новорожденной самки мыши с целевым нокаутом по *Wnt4*; видно, что развития почки не произошло. Кроме того, яичник начинает синтезировать тестостерон и становится окруженным модифицированной системой мужских половых протоков

зикул, упаковкой в липопротеиновые частицы (Tang et al., 2012; Saito-Diaz et al., 2013; Solis et al., 2013).

СЕКРЕЦИЯ WNT: ОТРИЦАТЕЛЬНАЯ ОБРАТНАЯ СВЯЗЬ НА ВХОДЕ

Секретированные белки Wnt связываются с глипиканами (разновидностью гепарансульфата протеогликанов) внеклеточного матрикса, что ограничивает их диффузию и приводит к накоплению Wnt вблизи источника продукции. Когда Wnt присоединяется к рецептору Frizzled на отвечающей клетке, клетка выделяет гидролазу Notum, которая связывается с глипиканами и затем отщепляет присоединенные к Wnt липиды в ходе процесса *деацилизации* или *делипидации* (Kakugawa et al., 2015). Этот процесс ограничивает сигнальную функцию Wnt, поскольку липиды необходимы для связывания Wnt с Frizzled, и тем самым создает механизм отрицательной обратной связи для предотвращения избыточного поступления сигналов Wnt.

У рецептора Frizzled есть уникальная гидрофобная полость, адаптированная к взаимодействию с липидными остатками белков Wnt; конформационное связывание Notum также имитируется ее структурой (рис. 4.25А, Б). Избыточная экспрессия Notum в крыловом имажинальном диске *Drosophila* вызывает снижение экспрессии генов-мишеней Wnt/Wg; клональная утрата *Notum*, напротив, приводит к увеличению экспрессии генов-мишеней Wnt. Интересно,

⁴¹ По ссылке <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/> можно ознакомиться с исчерпывающим списком всех белков Wnt и компонентов сигнального пути Wnt.

² У мух мутации в гене *porcupine* приводят к нарушениям сегментации у личинки, в силу которых на ней образуются выросты, напоминающие иглы дикообраз (Perrimon et al., 1989). Помните историю с названием Hedgehog? Porcupine специализируется на пальмитировании Wnt, а пальмитирование Hedgehog осуществляет похожий фермент под названием Nhat.

что экспрессия гена *Notum* повышается в чувствительных к Wnt клетках, создавая механизм отрицательной обратной связи (рис. 4.25B; Kakugawa et al., 2015; Nusse, 2015). Notum не единственный ингибитор связывания Wnt с его рецептором; множество имеющихся антагонистов, включая секретлируемый связанный с Frizzled белок (secreted frizzled-related protein, sFRP), фактор ингибирования Wnt (Wnt inhibitory factor, Wif) и членов семейства Dickkopf (Dkk) (Niehrs, 2006). Совмещение многочисленных механизмов секреции Wnt, ограничения глипиканами, секретлируемые ингибиторы лигандов и отрицательная обратная связь обеспечивают одновременно разнообразие и стабильность градиентов лигандов Wnt и ответов этого сигнального пути.

КАНОНИЧЕСКИЙ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ WNT (ЗАВИСИМЫЙ ОТ β -КАТЕНИНА)

Первым охарактеризованным сигнальным путем Wnt был канонический *сигнальный путь Wnt/ β -катенин*, кульминацией которого является активация транскрипционного фактора β -катенина и модуляция экспрессии специфичных генов (рис. 4.26A; Chien et al., 2009; Clevers and Nusse, 2012; Nusse, 2012; Saito-Diaz et al., 2013). В сигнальном пути Wnt/ β -катенина члены семейства Wnt с липидными остатками взаимодействуют с парой трансмембранных рецепторных белков: белком из семейства Frizzled и большим трансмембранным белком LRP5/6 (Logan and Nusse, 2004; MacDonald et al., 2009).

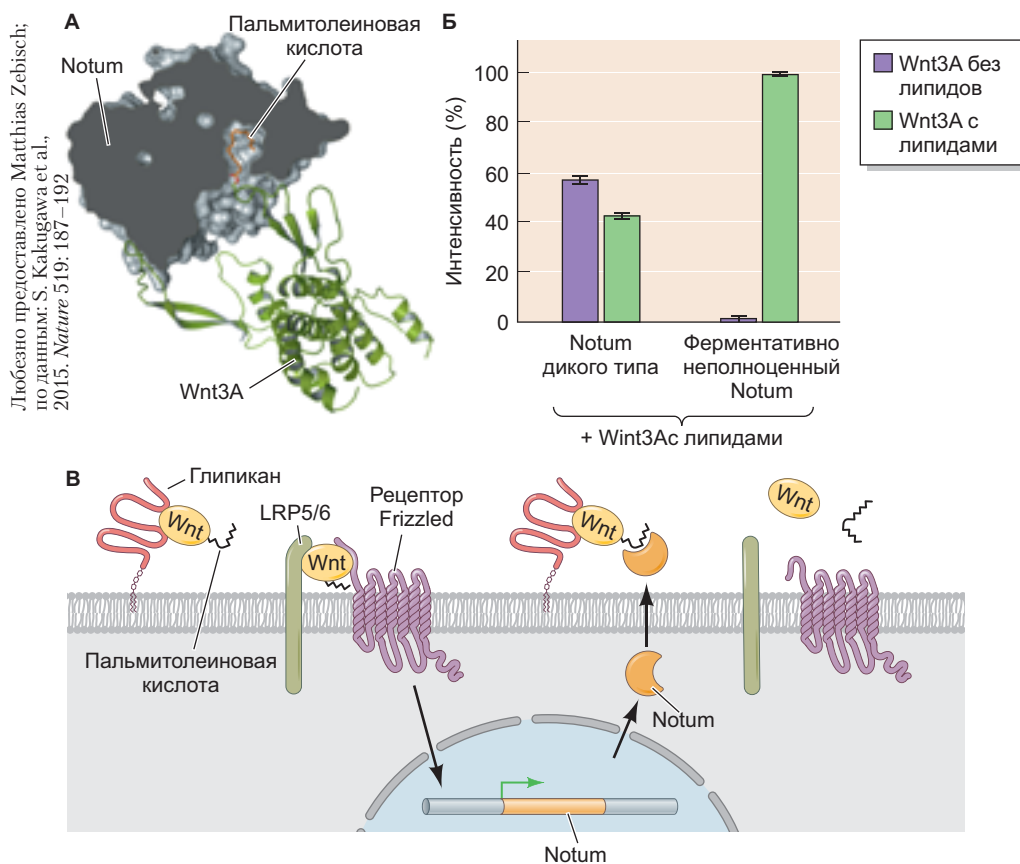


Рис. 4.25. Антагонизм Notum и Wnt. **А.** Структуры Notum (серый) и Wnt3A (зеленый) в связанном виде. На этой схеме визуализации активного центра Notum показано его связывание с остатком пальмитолеиновой кислоты на Wnt3A (оранжевый). **Б.** Будучи связанным, Notum обладает гидролазной ферментативной активностью, направленной на отщепление липидов от Wnt3A, что делает его неспособным к взаимодействию с рецептором Frizzled. Показанные здесь данные демонстрируют необходимость гидролазной активности для полноценной делипидации Wnt3A. Notum с нарушенной ферментативной активностью не способен отщепить липидные группы от Wnt3A (без липидов, фиолетовые столбики), в отличие от Notum дикого типа. **В.** Модель внеклеточной регуляции Wnt. Wnt с липидами может связываться с рецептором Frizzled и большим трансмембранным белком LRP5/6, а также с глипиканами (гепарансульфатсодержащими протеогликанами). Активация сигнального пути Wnt ведет к производству Notum, который секретируется и взаимодействует с глипиканами, отщепляя от связанного с ними белка Wnt остатки пальмитолеиновой кислоты. Таким образом, сигнальный путь Wnt запускает опосредованный Notum механизм отрицательной обратной связи. (Рис. Б, В по данным: S. Kakugawa et al., 2015. *Nature* 519: 187–192.)

в основе обоих сигнальных путей Wnt и Hedgehog: активация часто происходит путем инактивации ингибитора.

НЕКАНОНИЧЕСКИЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ WNT (НЕЗАВИСИМЫЕ ОТ В-КАТЕНИНА)

Белки Wnt не только посылают сигналы в ядро, но и могут вызывать в цитоплазме изменения, влияющие на форму, поведение, функционирование клеток. Такие альтернативные, или *неканонические*, сигнальные пути можно разделить на два типа: *сигнальный путь планарной клеточной полярности* и *Wnt/Ca²⁺-сигнальный путь* (рис. 4.26Б, В).

Сигнальный путь планарной клеточной полярности, или PCP (от англ. planar cell polarity), регулирует микротрубочки и актиновый цитоскелет, влияя на форму клеток, в том числе на образование направленных выпячиваний, необходимых для миграции клеток. Ряд белков Wnt (таких как Wnt5a и Wnt11) могут активировать Disheveled, связываясь с другим рецептором (Frizzled с паре с Ror вместо LRP5), и Ror-содержащий рецепторный комплекс фосфорилирует Disheveled, позволяя ему взаимодействовать с Rho-ГТФазами (Grumolato et al., 2010; Green et al., 2014). Rho-ГТФазы упрощенно можно рассматривать как «прорабов» клетки из-за способности активировать спектр других белков (киназ и белков, связывающихся с цитоскелетом), которые перестраивают элементы цитоскелета, влияя на форму и движение клеток. Роль передачи сигнала Wnt по пути PCP особенно заметна при поведении клеток в пределах одного тканевого пласта, что и объясняют слова *планарная полярность* в его названии. Сигнальный путь Wnt/PCP может направлять клетки к делению в плоскости пласта (вместо того чтобы образовывать верхний и нижний ярусы ткани) и передвигаться внутри его (Shulman et al., 1998; Winter et al., 2001; Ciruna et al., 2006; Witte et al., 2010; Sepich et al., 2011; Ho et al., 2012; Habib et al., 2013). У позвоночных подобная регуляция деления и миграции клеток важна для выделения зародышевых листков и удлинения передне-задней оси в ходе гастрюляции.

Как следует из названия, активность сигнального пути Wnt/Ca²⁺ приводит к выходу кальция, запасенного в клетке, а кальций действует как важный *вторичный мессенджер*, модулирующий работу многих нижестоящих мишеней. В данном сигнальном пути связывание Wnt с рецепторным белком (возможно, Ryk, одиночным или вместе с Frizzled) активирует фосфолипазу (PLC), ферментативная активность которой косвенно приводит к выходу ионов кальция из гладкого эндоплазматического ретикулума (рис. 4.26В). Свободный кальций может активировать ферменты, факторы транскрипции и трансляции. У *Danio* с дефектами Ryk нарушен запускаемый



Загадки развития

Насколько различны сигнальные пути Wnt/β-катенина, Wnt/Ca²⁺ и Wnt/PCP? Можно сказать, что значительная трудность на пути к пониманию передачи сигналов Wnt состоит в том, чтобы выяснить, как взаимодействуют различные пути. Вероятно, нам требуется более интегративное представление о передаче сигналов, способное предсказывать взаимодействие не только канонических и неканонических сигнальных путей Wnt, но и сигнальных путей всех прочих паракринных факторов (Wnt, Hedgehog, FGF, BMP и т. д.). Что вы об этом думаете? Как бы вы подошли к изучению взаимодействия значимых сигнальных путей?

Wnt выход кальция в их внутренних депо, что в итоге нарушает направленное движение клеток (Lin et al., 2010; Green et al., 2014).

Несмотря на то что все три сигнальные пути Wnt (β-катенина, PCP, кальция) обладают различными первичными функциями, накапливаются данные, указывающие на значительные перекрестные взаимодействия между ними (van Amerongen and Nusse, 2009; Thrasyvoulou et al., 2013). Так, было показано, что путь передачи сигнала Wnt5 через кальций *антагонистичен* по отношению к сигнальному пути Wnt/β-катенина в ходе гастрюляции и развития конечности позвоночных (Ishitani et al., 2003; Topol et al., 2003; Westfall et al., 2003).

Суперсемейство TGFβ

В **суперсемейство TGFβ¹** входит более 30 членов с близкой структурой, регулирующих некоторые из важнейших взаимодействий в ходе развития (рис. 4.27). Суперсемейство TGFβ включает семейства TGFβ, Nodal и Activin, морфогенетических белков кости (bone morphogenetic proteins, BMP), Vg1 и другие белки, включая глиальный нейротрофический фактор (glial-derived neurotrophic factor, GDNF), необходимый для дифференцировки нейронов почек и кишечника, и антимюллеров гормон (anti-Müllerian hormone, AMH) — паракринный фактор, участвующий в определении пола у млекопитающих. Ниже мы приводим сводку по трем из этих семейств, наиболее широко используемым в ходе развития: TGFβ, BMP, Nodal/Activin.

¹ TGF, или transforming growth factor — трансформирующий фактор роста. Обозначение «суперсемейство» используют, когда каждый из различных классов молекул в нем представляет собой семейство. Члены суперсемейства обладают близкими структурами, но не настолько похожи друг на друга, как молекулы внутри одного семейства.

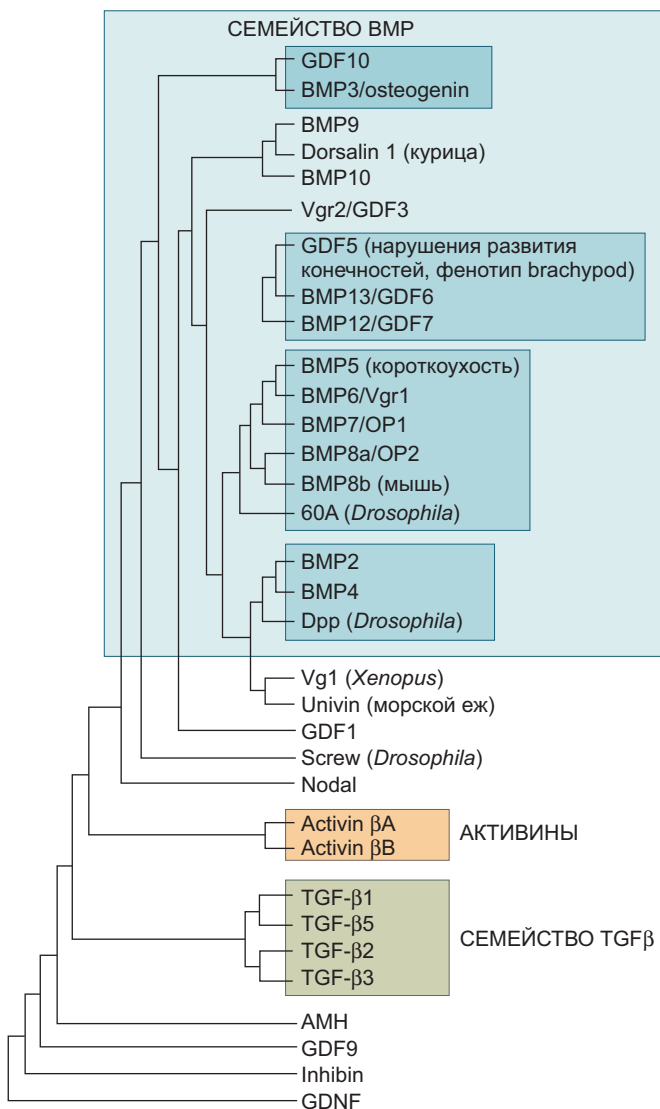


Рис. 4.27. Взаимосвязи членов суперсемейства TGFβ. (По данным: B. L. M. Hogan, 1996. *Genes Dev* 10: 1580–1594; организацию семейства BMP провели A. Celeste и V. Rosen из Института Генетики, Кембридж, Массачусетс, США)

TGFB

Члены **семейства TGFβ**, TGFβ1, 2, 3 и 5 важны для регуляции образования внеклеточного матрикса и для регуляции деления клеток (как положительной, так и отрицательной). TGFβ1 повышает количество производимого эпителиальными клетками внеклеточного матрикса (одновременно стимулируя синтез коллагена и фибронектина и ингибируя деградацию матрикса). Белки TGFβ могут играть решающую роль в определении мест ветвления эпителиальных протоков в почках, легких и слюнных железах (Daniel, 1989; Hardman et al., 1994; Ritvos et al., 1995). Эффекты отдельных членов семейства TGFβ трудно разделить, потому что они действуют

схожим образом, экспрессируются вместе и компенсируют отсутствие друг друга.

BMP

Члены **семейства BMP** отличаются от других членов суперсемейства TGFβ наличием семи (вместо девяти) консервативных цистеинов в зрелой полипептидной цепи. Они были открыты в связи со своей способностью вызывать образование кости и названы **морфогенетическими белками кости**. Однако образование BMP лишь одна из их многочисленных функций. Обнаружено, что BMP регулируют деление клеток, апоптоз (программированную клеточную гибель), миграцию и дифференцировку клеток (Hogan, 1996). К ним относят такие белки как BMP4 (в одних тканях вызывает образование кости, в других — определение пути развития эпидермиса, а в ряде случаев — пролиферацию или гибель клеток) и BMP7 (важен для установления полярности нервной трубки, развития почек и образования сперматозоидов). Гомолог BMP4 у *Drosophila* необходим для образования конечностей, в том числе ног, крыльев, гениталий и антенн. Своим названием Decapentaplegic (Dpp) этот гомолог обязан нарушениям в развитии 15 таких структур. Оказалось, что BMP1 вовсе не относится к семейству BMP, а является протеазой. Считается, что белки BMP работают, диффундируя из производящих их клеток (Ohkawara et al., 2002). Их ингибиторы, такие как Noggin и Chordin, связываются непосредственно с BMP, мешая их взаимодействию с рецепторами. Мы разберем этот морфогенетический механизм детальнее, когда будем обсуждать установление дорсально-вентральной оси гастрюлы (см. гл. 11).

NODAL/ACTIVIN

Белки **Nodal** и **Activin** чрезвычайно важны для определения статуса различных областей мезодермы и установления различий между правой и левой сторонами тела позвоночных. На лево-правую асимметрию у билатеральных животных оказывает большое влияние градиент Nodal, направленный с правой стороны эмбриона к левой. У позвоночных этот градиент, по-видимому, создается за счет биения ресничек, способствующего плавному перетеканию Nodal через среднюю линию тела (Babu and Roy, 2013; Molina et al., 2013; Blum et al., 2014; Su, 2014).

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ SMAD

Члены суперсемейства TGFβ активируют транскрипционные факторы **семейства Smad** (Heldin et al., 1997; Shi and Massagué, 2003). Лиганд TGFβ связывается с рецептором TGFβ II типа, что позволяет этому ре-

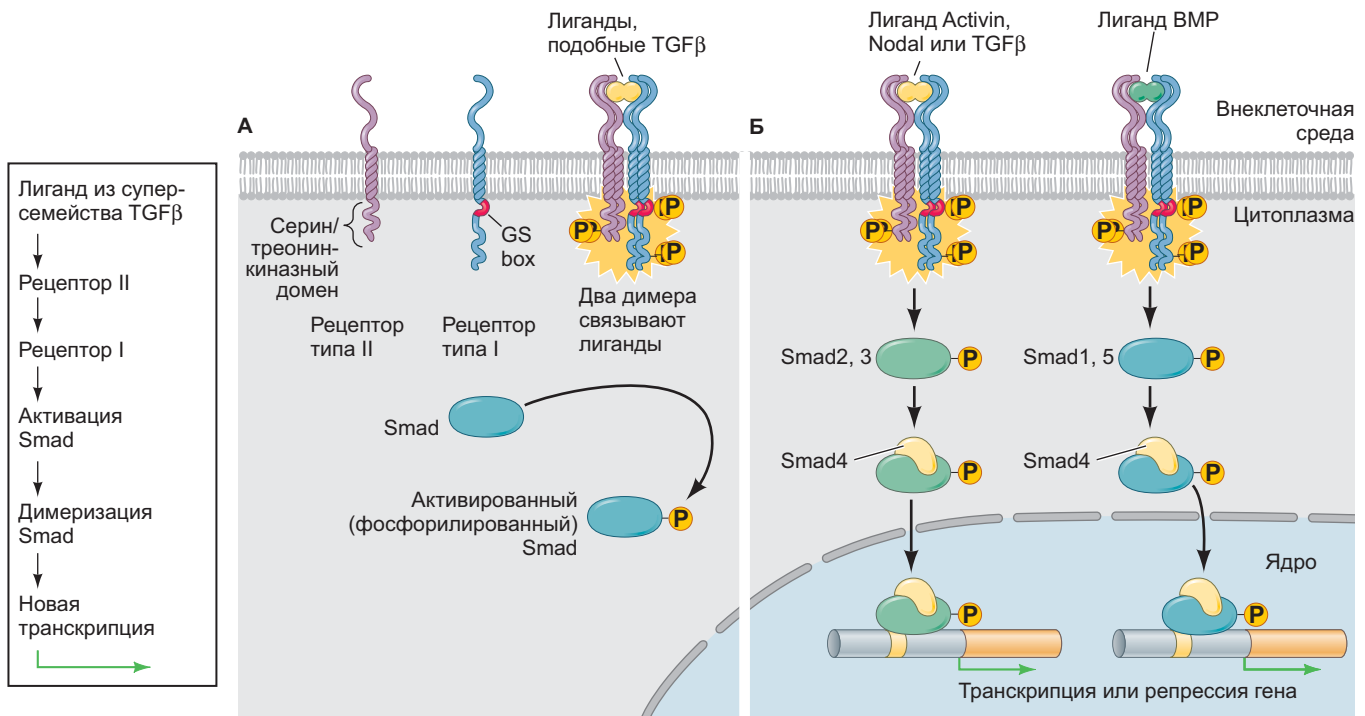


Рис. 4.28. Активация сигнального пути Smad лигандами суперсемейства TGFβ. **А.** При связывании лиганда с рецепторами I и II типов образуется комплекс активации, что позволяет рецептору II типа фосфорилировать рецептор I типа по определенным остаткам серина и треонина. Фосфорилированный белок рецептора I типа приобретает способность фосфорилировать белки Smad (СГ-домен, или GS box — домен, богатый повторами серина и глицина). **Б.** Рецепторы, связывающие белки семейства TGFβ и члены семейства активинов, фосфорилируют белки Smad2 и 3. Рецепторы, связывающие белки семейства BMP, фосфорилируют белки Smad1 и 5. Эти белки Smad могут образовывать со Smad4 комплексы, становясь активными транскрипционными факторами. Слева представлена упрощенная версия сигнального пути

цептору взаимодействовать с рецептором TGFβ I типа. Как только контакт между двумя рецепторами установлен, рецептор II типа фосфорилирует серин или треонин в составе рецептора I типа, активируя его. Активированный рецептор I типа теперь может фосфорилировать белки Smad¹ (рис. 4.28А). Из факторов TGFβ Smad1 и 5 активируются членами семейства BMP, а то время как рецепторы, Activin, Nodal и члены семейства TGFβ фосфорилируют белки Smad2 и 3. Перечисленные белки Smad после фосфорилирования связываются со Smad4, образуя комплексы-факторы транскрипции, проходящие в ядро и регулирующие экспрессию генов (рис. 4.28Б).

Другие паракринные факторы

Хотя большинство паракринных факторов являются членами одного из четырех перечисленных выше основных семейств (FGF, Hedgehog, Wnt и суперсемейства TGFβ), у некоторых из них близких «род-

ственников» мало или нет совсем. Эпидермальный фактор роста, фактор роста гепатоцитов, нейротрофины, фактор стволовых клеток не входят в эти четыре группы, но каждый из них играет важную роль в ходе развития. Кроме того, существует множество паракринных факторов, задействованных чуть ли не исключительно в развитии клеток крови: эритропоэтин, цитокины, интерлейкины. Еще один класс паракринных факторов был впервые описан в связи с его ролью в направлении миграции клеток и роста аксонов, и включает семейства нетринов, семафоринов и Slit. Теперь известно, что эти классические направляющие молекулы (такие как нетрины) тоже регулируют экспрессию генов. Мы обсудим все эти паракринные факторы в контексте их значения для развития в дальнейших главах этой книги.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Ауксин: морфоген растений

Рост, применительно к животным или растениям, может означать деление, вытягивание, увеличение и даже дифференцировку клеток. Семейство растительных гормонов ауксинов (от греч. αὔξω —

¹ Исследователи назвали эти белки Smad, соединив названия первых идентифицированных членов семейства: белка *C. elegans* SMA и белка *Drosophila* Mad.

расти) — пожалуй, наиболее изученный регулятор роста растений. Ауксин и сопутствующая ему машинерия имеют длинную эволюционную историю, и она восходит к первым наземным растениям — таким как мхи и печеночники — и даже к предковым зеленым водорослям. Ауксин задействован в становлении многих ключевых аспектов эмбриогенеза растений, от определения траектории развития клеток вдоль апикально-базальной оси до морфогенеза боковых корней и образования зубчатого края, присущего некоторым листьям. Ауксин служит сигнальной молекулой, близкой к паракринным факторам и удовлетворяющей большинству критериев морфогена, но все же работает несколько иначе, чем обсуждаемые выше ростовые факторы у животных. Здесь мы подробнее рассмотрим ряд ключевых функций ауксина, задействованные пути передачи сигнала и уникальный механизм, используемый для установления градиентов концентрации ауксина.

ОПОСРЕДОВАННАЯ АУКСИНОМ АПИКАЛЬНО-БАЗАЛЬНАЯ ПОЛЯРНОСТЬ

Апикально-базальная организация большинства взрослых организмов — изнутри наружу у животных и от побегов к корням у растений — закладывается в ходе раннего эмбриогенеза. Какие сигналы обеспечивают раннее определение осей у растений? В своей книге «Способность к движениям у растений» Чарльз Дарвин предсказывал существование ауксина, однако химическая структура **ауксина**, или **индолил-3-уксусной кислоты** (ИУК), была открыта в 1935 г. Тиманном и Коепфли. Было показано, что ауксин играет ключевую роль в установлении апикально-базальной полярности у растений (Möller and Weijers, 2009; Robert et al., 2015; Smit and Weijers, 2015; ten Hove et al., 2015; Weijers and Wagner, 2016; Jiang et al., 2018). Как и у большинства эмбриофитов, у *Arabidopsis thaliana* морфологические различия вдоль апикально-базальной оси устанавливаются с первым делением зиготы, в результате которого образуется две клетки разного размера (рис. 1.8). Напомним, что апикальная клетка развивается в собственно эмбрион, проходящий стадию октанта, глобулярную и сердцевидную стадии эмбриогенеза, после чего возникают апикальные меристемы побега и корня, гипокотиль и семядоли. Как ауксин влияет на развитие меристем, гипокотили и семядолей в правильном положении вдоль апикально-базальной оси зародыша растения?

СИНТЕЗ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АУКСИНА

Замечательный аспект сигнального пути ауксина — способ дифференциального распределения этого гормона по растению. Для картирования распределения ауксина в эмбрионе растения иссле-

дователи создали трансгенный сорт *A. thaliana*, несущий конструктор (*DR5rev: GFP*), в котором *GFP* поставлен под чувствительный к ауксину промотор *DR5*. В результате у этих растений в местах активности ауксина экспрессируется *GFP* и предоставляется удобный способ мониторинга сигнального пути ауксина на протяжении эмбрионального развития (**рис. 4.29А**). Ауксин движется от клетки к клетке путем как диффузии, так и активного транспорта, в результате чего отдельные участки накапливают разные концентрации гормона. Области, аккумулирующие ауксин, называют *стоками* ауксина, а самую высокую и самую низкую его концентрации — максимумом и минимумом ауксина соответственно. Максимумы ауксина у эмбриона можно наблюдать в клетках, которые разовьются в апикальную меристему корня, а также в верхушке каждой из семядолей (см. рис. 4.29А). Такие ферменты как YUCCA (*YUC*) и триптофанаминоминотрансфераза арабидопсиса 1 (*TAA1*) катализируют биосинтез ауксина в наиболее апикальных клетках октанта и 16-клеточного эмбриона (рис. 4.29Б и **4.30А**). Это указывает на расположение основного источника ауксина с противоположной стороны эмбриона относительно стока, в наиболее базальных клетках, проявляющих максимальную чувствительность к ауксину.

В силу своих жестких клеточных стенок растения развили сложные механизмы межклеточной коммуникации. В случае с ауксином такая коммуникация по большей части опирается на полярность распределения переносчиков ауксина, известных как белки PIN (Friml et al., 2003). Основная функция белков PIN заключается в перемещении ауксина изнутри клетки наружу — процессе, известном как **«выходной» транспорт** (efflux transport) (рис. 4.29Б). Специфичные трансмембранные белки PIN зачастую асимметрично локализованы на одной стороне клеточной поверхности, увеличивая выход ауксина с этой стороны. Таким образом, стратегическая *полярная* экспрессия «выходных» переносчиков PIN определяет направление движения ауксина в пределах эмбриона (как и в пределах тканей взрослого растения), и было показано, что PIN-зависимые потоки ауксина имеют решающее значение для морфогенеза. У мутантов *A. thaliana* по *pin1-1* с отсутствующим белком выброса ауксина PIN1 не разделяются семядоли и нарушается способность апикальной меристемы побега к образованию органов (рис. 4.29В; Liu et al., 1993). В эмбрионе на стадии октанта целевое расположение переносчиков PIN создает базальный ток ауксина от апикальных клеток к будущим клеткам корня. По мере продолжающегося развития эмбриона ток ауксина перенаправляется, что приводит к образованию апикального и базального максимумов

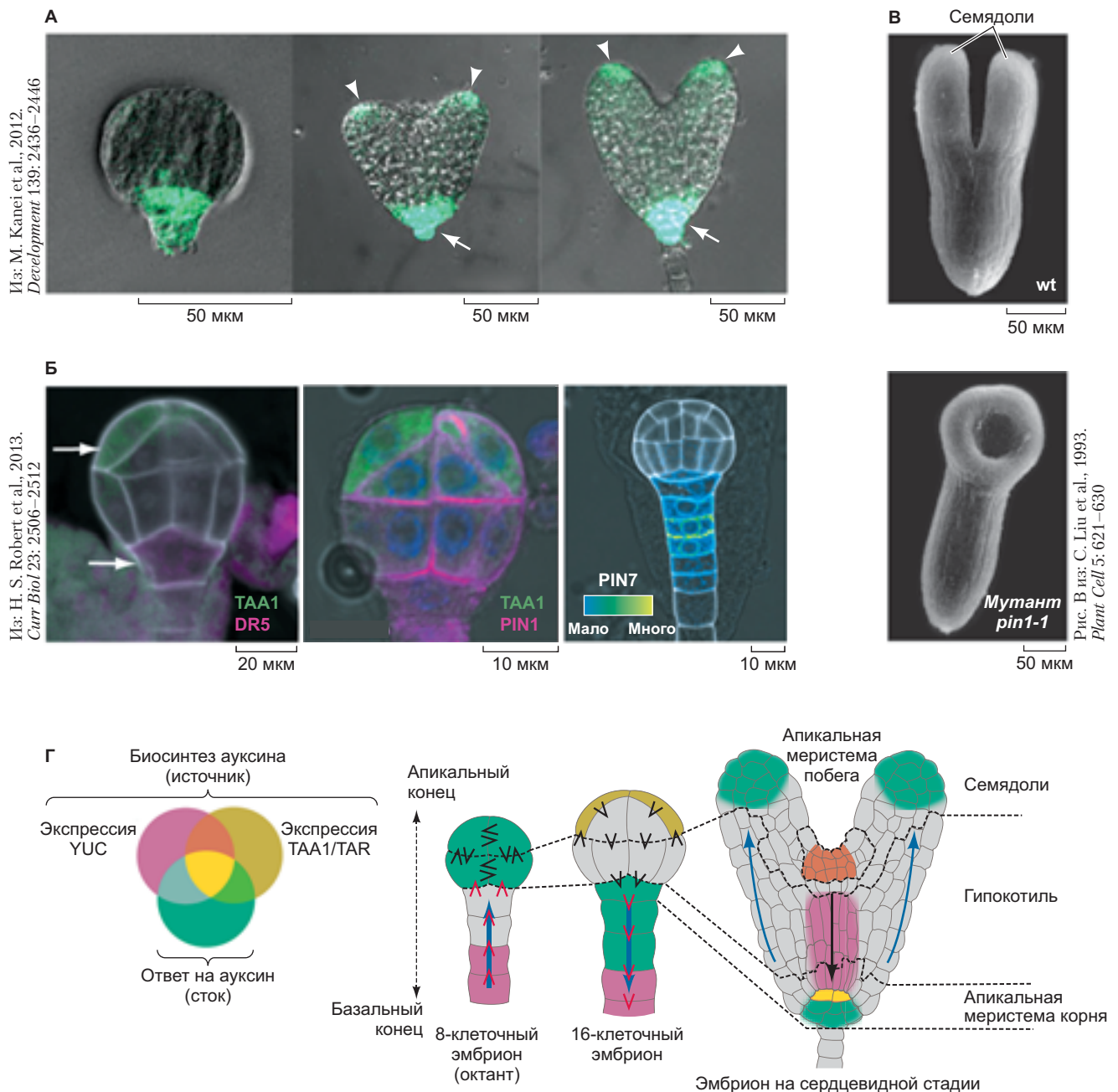


Рис. 4.29. Действие сигналов ауксина в ходе определения апикально-базальной полярности в эмбрионе *Arabidopsis thaliana*. **А.** Трансгенные эмбрионы с чувствительным к ауксину репортером *DR5rev: GFP*, экспрессирующим зеленый флуоресцентный белок в клетках с максимальной активностью ауксинзависимых генов. В ходе раннего развития экспрессия сконцентрирована в апикальных клетках семядолей (*треугольники*) и в апикальной меристеме корня (*стрелка*). **Б.** За счет работы таких ферментов, как TAA1 (первая панель; *зеленая флуоресценция*), ауксин синтезируется в наиболее апикальных клетках эмбриона на стадии октанта. Затем он перемещается к предшественникам апикальной меристемы корня (первая панель; обозначен опосредованной DR5 *пурпурной флуоресценцией*) через «выходные» переносчики PIN, такие как PIN1 (вторая панель; *пурпурная флуоресценция*) и PIN7 (третья панель; *голубая/зеленая флуоресценция*). **В.** В результате утраты PIN1 у мутантов *pin1-1* совершенно не происходит разделения семядолей. **Г.** Схема модели транспорта ауксина от источника к стоку. В синтезе ауксина участвуют ферменты YUC и триптофанамиотрансфераза арабидопсиса/связанный с триптофанамиотрансферазой фермент (TAA1/TAR). Цветами обозначены области эмбриона, в которых экспрессируются эти ферменты и чувствительные к ауксину гены. *Черные и красные галочки* указывают направление транспорта ауксина, соответственно, через PIN1 и PIN7. *Синие стрелки* указывают общее направление движения ауксина. (Рис. Г из: H. S. Robert et al., 2015, *J Exp Bot* 66: 5029–5042.)

ауксина с градиентами снижающейся концентрации ауксина между ними (рис. 4.29Г; Robert et al., 2013, 2015).

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ АУКСИНА

Как сигнальная активность ауксина влияет на различия в экспрессии генов в разных областях эмбриона? Ауксин играет буквально «ключевую» роль в регуляции генов определения пути развития клетки, так как по сути «отпирает» блок транскрипции ауксин-зависимых генов. Нижестоящим эффекторным белком сигнального пути ауксина является фактор ответа на ауксин (auxin response factor, ARF) — транскрипционный фактор, регулирующий развертывание подчиненных ауксину программ определения пути развития клетки (рис. 4.30Б; Roosjen et al., 2018)¹. При низкой концентрации ауксина работу ARF ингибирует связывание с репрессором ауксина AUX/IAA. (Из-за сходства этого названия с названием самого ауксина возможна путаница; чтобы избежать ее, далее в тексте этот репрессор будет обозначен как AUX-Rep вопреки общепринятой номенклатуре.) Связывание AUX-Rep с ARF предотвращает экспрессию ауксин-зависимых генов. Когда AUX-Rep связывается с ARF, он привлекает корепрессор TOPLESS (TPL), который и обеспечивает репрессию ауксин-зависимых генов. При высокой концентрации ауксина гормон приводит к деградации белка AUX-Rep и освобождению ARF от ингибирования. Таким образом, путем двойного отрицания — ингибирования ингибитора — ARF высвобождается, а транскрипция ARF-зависимых генов становится возможной (Weijers and Wagner, 2016; Roosjen et al., 2018).

Представленное здесь описание сигнального пути ауксина очень сильно упрощено, и важно понимать, что существует множество дополнительных способов влияния на активность и распределение ауксина. Например, ауксин могут захватывать и за счет этого обратимо инактивировать конъюгирующие белки, а на движение ауксина могут влиять другие классы транспортных белков (см. рис. 4.30Б; Jiang et al., 2018). Высказано предположение, что различия в концентрации ауксина приводят к дифференциальной экспрессии генов, которая влияет на установление различных клеточных судеб на протяжении жизни растения, как это происходит с описанными выше классическими морфогенами. Интереснее всего осознавать, что, несмотря на долгую независимую эволюцию растений и животных, путь передачи сигнала ауксина работает посредством отрицательной регуляции своего ингибитора, совсем как сигнальные пути Hedgehog и Wnt у животных.

Клеточная биология паракринной сигнализации

Влияние паракринных сигналов на процессы развития опосредованы клеточными механизмами, которые формируют, ограничивают и поддерживают презентацию, секрецию и рецепцию сигнальных молекул. Что это за механизмы и как они помогли создать широкое разнообразие морфологических паттернов?

ДИФфуЗИЯ ПАРАКРИННЫХ ФАКТОРОВ

Паракринные факторы не плавают в межклеточном пространстве свободно. Их связывают клеточные мембраны и внеклеточный матрикс тканей. В ряде случаев это связывание может препятствовать распространению паракринного морфогена и даже направлять паракринный фактор на деградацию (Capurro et al., 2008; Schwank et al., 2011). К примеру, белки Wnt не диффундируют далеко от выделяющих их клеток без помощи других белков. Таким образом, диапазон охвата факторов Wnt значительно увеличивается, если близлежащие клетки выделяют белки, связывающие паракринные факторы и препятствующие их преждевременному взаимодействию с тканью-мишенью (рис. 4.31; Mulligan et al., 2012). Схожим образом **гепарансульфатсодержащие протеогликаны** (ГСПГ) внеклеточного матрикса часто модулируют стабильность, рецепцию, скорость диффузии и вид градиента концентрации белков FGF, BMP и Wnt (Akiyama et al., 2008; Yan and Lin, 2009; Berendsen et al., 2011; Christian, 2011; Müller and Schier, 2011; Nahmad and Lander, 2011).

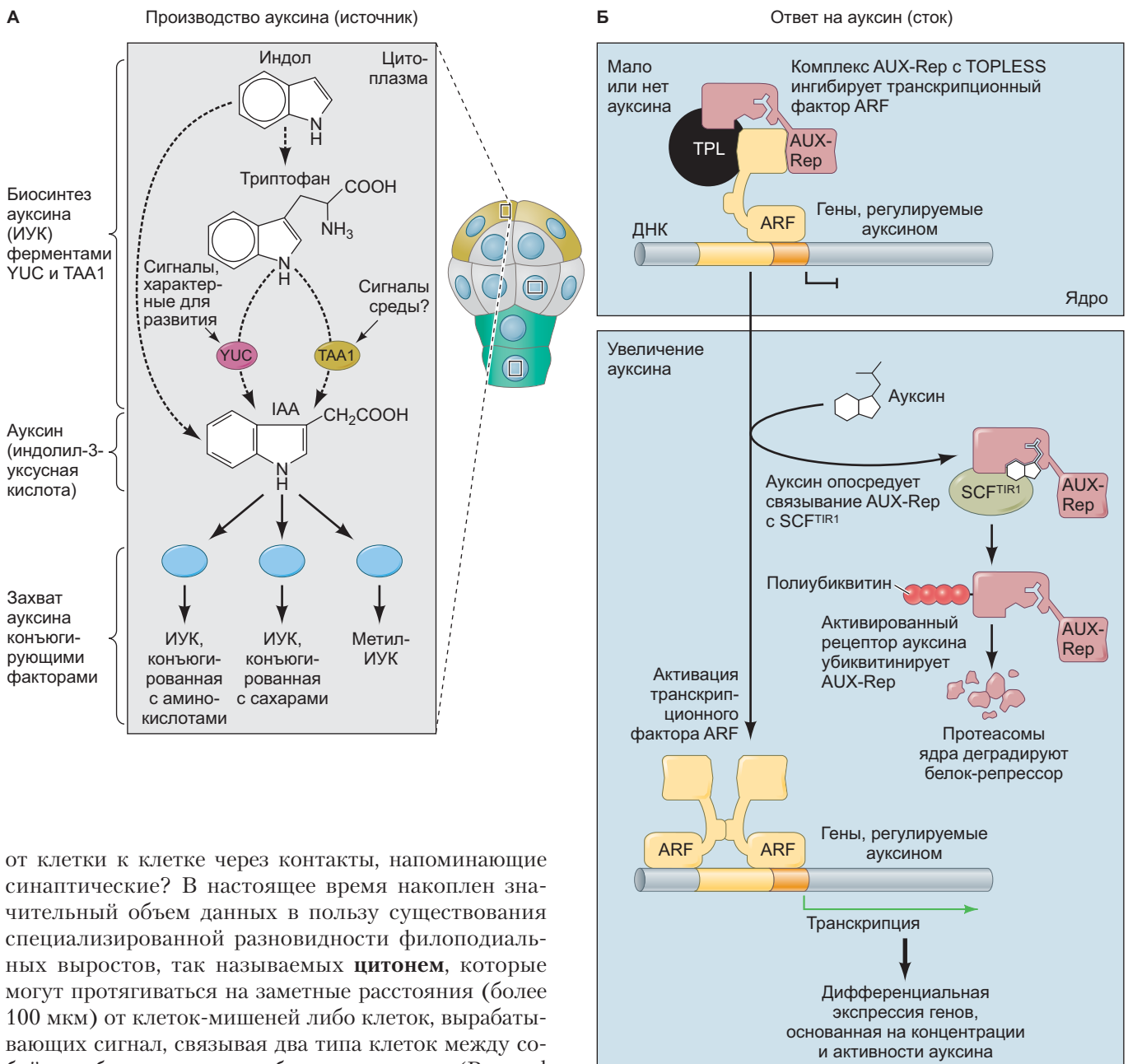
Локальные выросты мембраны как источник сигналов

Мы обсудили роль секретлируемых факторов роста в межклеточных коммуникациях как ближнего, так и дальнего действия. А существуют ли механизмы презентации сигнала без его выделения? В таком сценарии производящая клетка *физически протягивает* и презентует сигнал. Здесь мы представим появившиеся идеи о том, как два типа динамичных выростов мембраны могут способствовать межклеточной коммуникации и даже создавать протяженные градиенты.

ФИЛОПОДИАЛЬНАЯ ЦИТОНЕМА

Что, если молекулы, которые мы считали диффундирующими паракринными факторами, движущимися во внеклеточной среде, на самом деле перемещаются

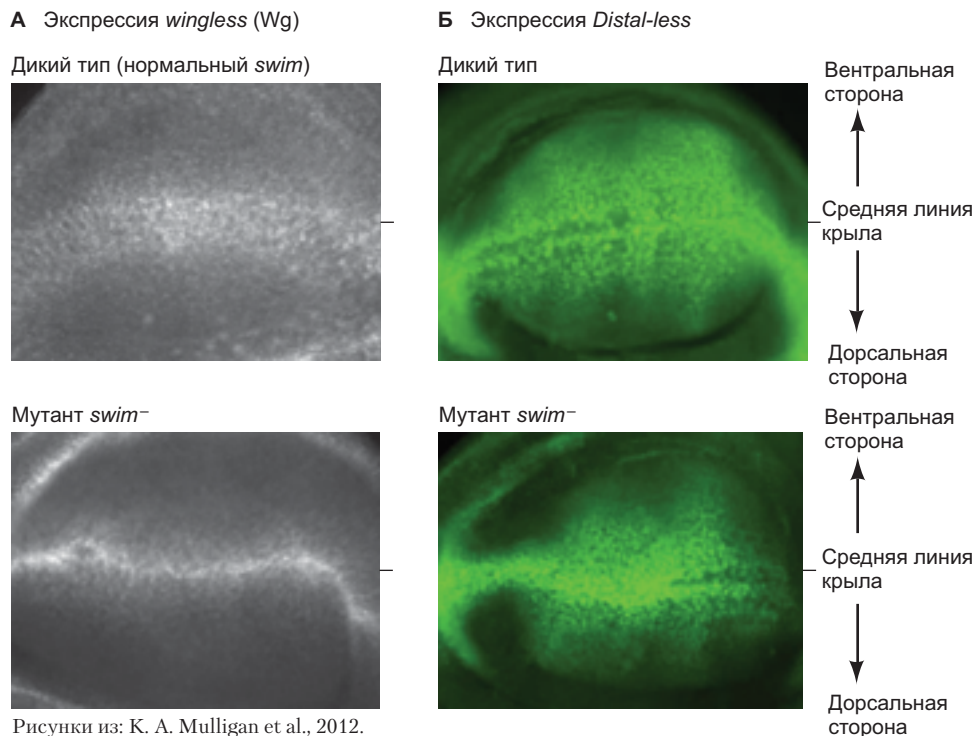
¹ Тератогенами называют внешние агенты, способные вызывать пороки эмбрионального развития; см. гл. 1 и 23.



от клетки к клетке через контакты, напоминающие синаптические? В настоящее время накоплен значительный объем данных в пользу существования специализированной разновидности филоподиальных выростов, так называемых **цитонем**, которые могут протягиваться на заметные расстояния (более 100 мкм) от клеток-мишеней либо клеток, вырабатывающих сигнал, связывая два типа клеток между собой подобно длинным мембранным каналам (Roy and Kornberg, 2015). В этой модели связывание лиганда с рецептором изначально происходит на кончиках цитонем клетки-мишени и вырабатывающей сигнал клетки, когда они располагаются ровно друг напротив друга. Комплекс лиганда с рецептором затем транспортируется по цитонеме к телу клетки-мишени.

Впервые опосредуемая цитонемами передача сигнала морфогена была описана в лаборатории Томаса Корнберга в его исследовании развития воздушных мешков и крылового диска у *Drosophila* (Roy et al., 2011). Кластер клеток под названием «зачаток воздушного мешка» (ЗВМ) развивается вдоль базальной поверхности крылового диска в ответ на градиенты морфогенов Dpp (гомолога BMP) и FGF в крыловом диске (рис. 4.32А, Б). В лаборатории Корнберга было открыто, что клетки ЗВМ вытягивают цитонемы к клеткам, выделяющим Dpp и FGF,

Рис. 4.30. Сигнальный путь ауксина: его производство и клеточные ответы. **А.** Пути биосинтеза и конъюгации в цитоплазме: производство и захват ауксина в апикальных клетках (оливковый) 16-клеточного эмбриона. **Б.** При низкой концентрации ауксина (серые клетки) в ядре фактор ответа на ауксин (ARF) связан с ингибитором AUX-Rep (известным как AUX/IAA) в комплексе с TOPLESS. Однако там, где уровень ауксина высок (изумрудные клетки), ауксин опосредует связывание AUX-Rep с убиквитиновой системой (SCF^{TIR1}), что ведет к убиквитинированию и протеасомной деградации AUX-Rep с последующей активацией фактором ARF транскрипции чувствительных к ауксину генов А. (Рис. А из: D. Weijers and J. Friml, 2009. *Cell* 136: 1172; рис. Б из: L. Taiz et al. *Plant Physiology and Development*, 6th Edition. Sinauer Associates: Sunderland, MA.)



Рисунки из: K. A. Mulligan et al., 2012.
Proc Natl Acad Sci USA 109: 370–377

Рис. 4.31. На диффузию Wnt влияют другие белки. **А.** Диффузию Wingless (Wg, паракринный фактор семейства Wnt) по развивающемуся крылу *Drosophila* дикого типа (*сверху*) усиливает белок Swim, который производится в некоторых клетках крыла и стабилизирует Wg. В отсутствие Swim, как у мутанта ниже, Wg не распространяется и остается в пределах узкой полосы экспрессирующих Wg клеток. **Б.** Схожим образом Wingless обычно активирует ген *Distal-less* (зеленый) в большей части крыла дикого типа (*сверху*). Однако у мух, мутантных по *swim* (*внизу*), зона экспрессии *Distal-less* ограничена областями вблизи полосы экспрессирующих Wg клеток

причем цитонемы несут рецепторы к этим морфогенам — для каждого свои. Более того, было зарегистрировано перемещение Dpp, связанного со своим рецептором на клетке ЗВМ, вдоль цитонемы к телу клетки. Передне-задняя разметка крылового диска за счет градиента сигналов Hedgehog (Hh) также, по-видимому, осуществляется через цитонемы (рис. 4.32В). Hedgehog доставляется из задней (постериорной) части крылового диска в переднюю по цитонемам, тянущимся от базолатеральных поверхностей передних клеток к производящим Hh задним клеткам (рис. 4.32Г, Д; Bischoff et al., 2013).

ЦИТОНЕМЫ У ПОЗВОНОЧНЫХ

Недавно проведенные исследования показали, что у позвоночных тоже есть цитонемы. Результаты работ лабораторий Майкла Брэнда и Штеффена Шолппа показали, что некоторые гастрულიрующие клетки транспортируют морфоген Wnt8a по выростам, напоминающим цитонемы. В этом случае цитонемы тянутся и передают морфоген Wnt8a от производящих его клеток к клеткам-мишеням (рис. 4.32Е; Luz et al., 2014; Stanganello et al., 2015). Присутствие взаимо-

действий с участием цитонем или подобных структур предполагают и в одном из классических примеров работы морфогенов, передне-задней разметке почки конечности тетрапод. В данном случае передне-задний градиент Sonic hedgehog (Shh) в почке конечности определяет правильное расположение пальцев (см. гл. 19). В почке конечности курицы клетки, как производящие Sonic hedgehog, так и расположенные спереди клетки-мишени, вытягивают филоподиальные выросты друг к другу и контактируют в местах локализации рецепторов Sonic hedgehog (Patched) (рис. 4.32Ж; Sanders et al., 2013).

? Загадки развития

Неужели все молекулы, считавшиеся паракринными факторами, распространяются исключительно путем контактирования цитонем, в противовес диффузии во внеклеточном матриксе? В последнее время этот вопрос всплывает в дискуссиях биологов развития. Какова ваша позиция? Вы «диффузионист» или «цитонемист»? Есть ли в развитии место для этих двух механизмов, а возможно, даже потребность в обоих?

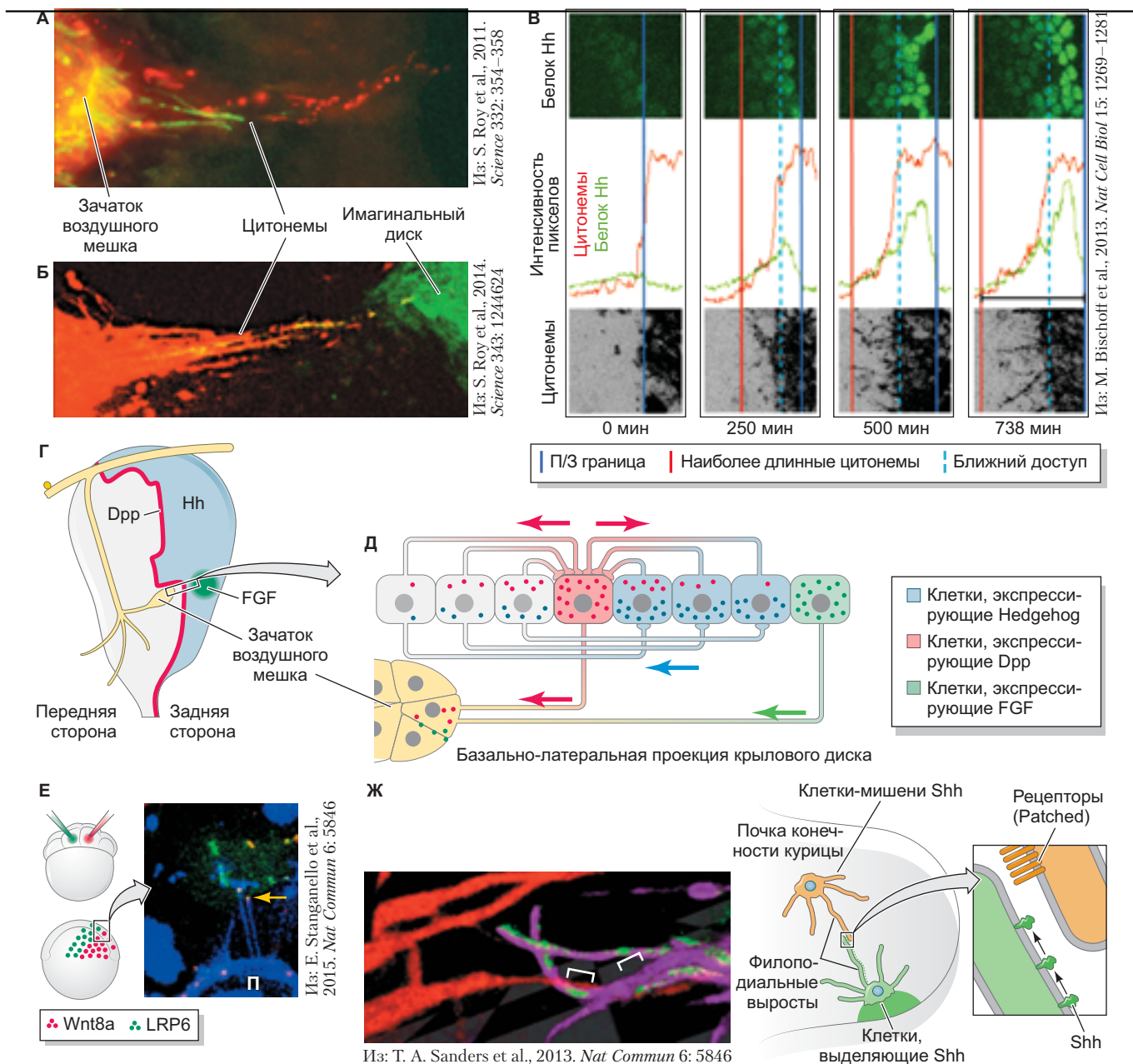


Рис. 4.32. Транспорт морфогенов по филоподиям. **А.** Цитонемы зачатка воздушного мешка (ЗВМ) вытягиваются к эпителию диска крыла *Drosophila*, чтобы передать морфогены (зеленый) и Dpp (красный), произведенные в диске крыла, назад к телам клеток ЗВМ. **Б.** Рецепторы Dpp перемещаются, связывают Dpp, произведенный в диске крыла, и возвращаются обратно к ЗВМ по цитонемам. **В.** Данная система цитонем в диске крыла *Drosophila* способна устанавливать градиент белка Hedgehog (Hh) (зеленый на верхних панелях и на графиках) на протяжении филоподиальных выростов (черные отростки на нижних панелях и красная линия на диске). **Г.** Изображение имагинального диска крыла *Drosophila* в ходе взаимодействия с клетками трахей, а именно ЗВМ. Клетки, экспрессирующие Hh, Dpp и FGF, отмечены синими, красными и зелеными областями. **Д.** Увеличенный поперечный срез участка, отмеченного рамкой на **Г**. Показаны выросты цитонем, идущие из клеток ЗВМ и между клетками диска крыла, а также выработка морфогенов и их транспорт по этим цитонемам (стрелки). **Е.** Wnt8a (красный) и его рецептор LRP6 (зеленый) были инъецированы в две различные клетки ранней бластулы *Danio*. Прижизненная визуализация этих клеток на стадии гастролы показала взаимодействия Wnt8a с рецептором LRP6 на кончиках филоподиальных выростов клеток — производителей лиганда (П, желтая стрелка). **Ж.** Было отмечено, что в почке конечности курицы длинные тонкие филоподиальные выросты тянутся как от клеток в задней части почки, производящих Sonic hedgehog (фиолетовая клетка с зеленым белком Shh на рисунке слева), так и от клеток в передней части почки (красные клетки). Эти противопоставленные филоподии напрямую взаимодействуют (скобки, рисунок слева), и, предположительно, именно в этот момент Shh связывается со своим рецептором (Patched) (рисунок справа)

ПЕРВИЧНАЯ РЕСНИЧКА

Часто рецепторы к паракринным факторам не распределены по клеточной мембране равномерно, а сгруппированы и расположены асимметрично. Например, рецепция белков Hedgehog в клетках позвоночных осуществляется на первичной ресничке, локальном выпячивании клеточной мембраны, содержащем микротрубочки (рис. 4.33А; Huangfu et al., 2003; Goetz and Anderson, 2010). Следует различать первичную ресничку и подвижные реснички вроде тех, что находятся в выстилке трахеи или гензеновском узелке эмбриона в ходе гастрюляции. Первичная ресничка гораздо короче подвижных, и ее по большей части упускали из виду до тех пор, пока не осознали прямую связь между ней и большим количеством заболеваний человека. Действительно, есть предположение, что некоторые из таких «ци-

лиопатий», затрагивающие различные части тела, например синдром Барде–Бидля, опосредованы непрямыми эффектами на передачу сигнала Hedgehog (Nachury, 2014). В отсутствие стимула белок Patched (рецептор Hedgehog; см. рис. 4.22) расположен на мембране первичной реснички, в то время как белок Smoothened — на мембране вблизи реснички либо в составе эндосом, направленных на деградацию. Patched ингибирует работу Smoothened, предотвращая его попадание в первичную ресничку (Milenkovic et al., 2009; Wang et al., 2009). Однако, когда Hedgehog связывается с Patched, Smoothened получает возможность провзаимодействовать с ним на мембране первичной реснички, где ингибирует белки PKA и SuFu, создающие репрессорную форму транскрипционного фактора Gli (рис. 4.33Б). Микротрубочки первичной реснички предоставляют каркас для двигательных белков, переносящих Patched

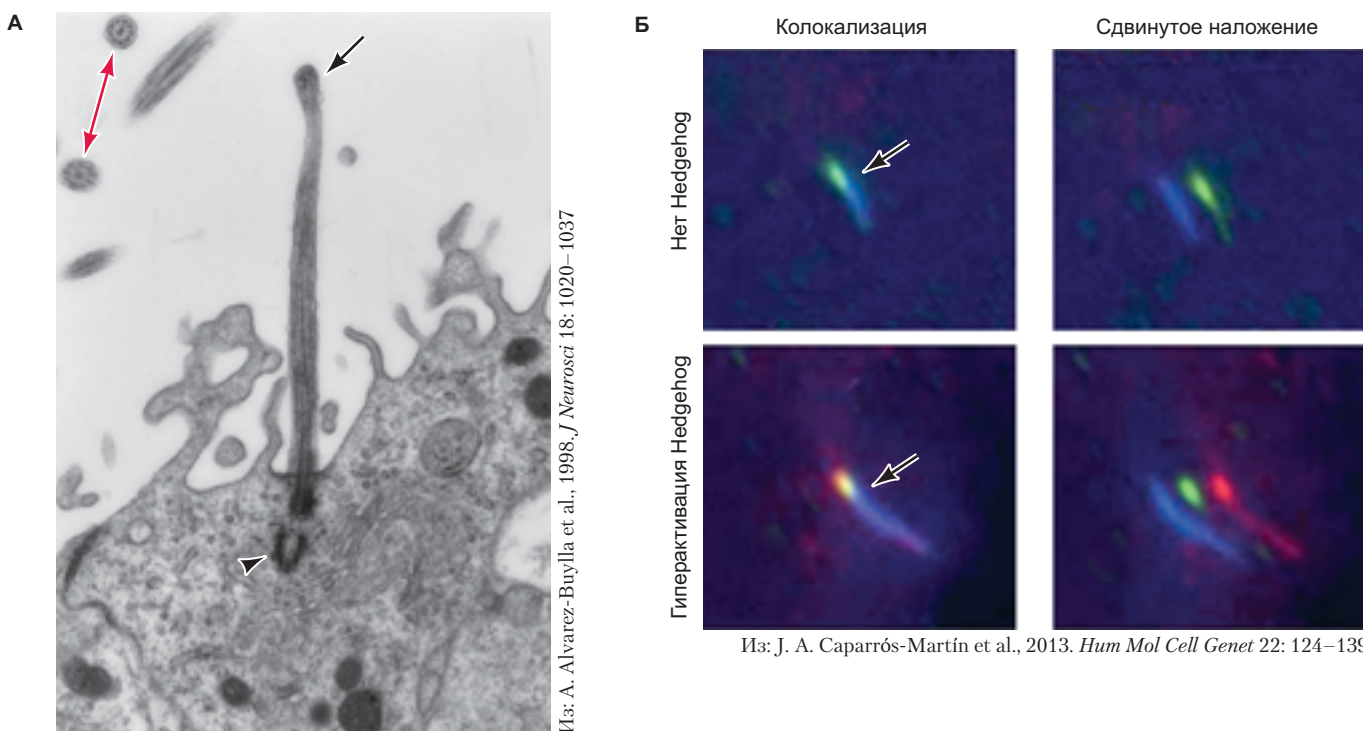


Рис. 4.33. Первичная ресничка в рецепции Hedgehog. **А.** Микрофотография, полученная на трансмиссионном электронном микроскопе, демонстрирует продольный срез первичной реснички (черная стрелка) «клетки В-типа», нейронной стволовой клетки в мозге взрослых млекопитающих (см. гл. 5). Видна центриоль, служащая базальным телом в основании реснички (треугольник); микротрубочки первичной реснички образуют структуру 8+0 (другим типам ресничек, например подвижным, обычно присуща структура 9+2, как видно на поперечных срезах в верхнем левом углу (красные стрелки). **Б.** Активация сигнального пути Hedgehog требует транспорта Smoothened в первичную ресничку. Здесь видна первичная ресничка фибробласта в культуре (стрелка; иммунофлуоресцентное окрашивание к ацетилированному тубулину: синий). Белок реснички Evc (окрашен зеленым) колокализуется со Smoothened (красный) после гиперактивации сигнального пути Hedgehog медикаментом SAG. Сравните колокализацию меток слева с наложением справа, в котором слои были сдвинуты, чтобы показать отдельные маркеры. Активация комплекса Evc-Smoothened на первичной ресничке ведет к полномасштабной активации сигнальной активности Gli

и Smoothed, как и активированные белки Gli, и мутации, нарушающие образование ресничек или их транспортные механизмы, также делают невозможной передачу сигналов Hedgehog (см. рис. 4.22; Mukhopadhyay and Rohatgi, 2014).

Юстакринная сигнализация в определении идентичности клеток

В ходе юстакринных взаимодействий белки из индуцирующей клетки взаимодействуют с рецепторными белками на соседних чувствительных клетках, не диффундируя от нее. Чаще всего задействованы юстакринные факторы, принадлежащие к трем семействам: **белки Notch** (они связываются с семейством лигандов, представленных, например, белком Delta), **молекулы клеточной адгезии**, такие как кадгерины, а также рецепторы **Eph** и их лиганды **эфрины**. Когда эфрин на одной клетке связывается с рецептором Eph на соседней, сигнал отправляется в обе клетки (Davy et al., 2004; Davy and Soriano, 2005). Нередко это сигналы притяжения или отталкивания, и эфрины зачастую работают в тех случаях, когда клеткам задают направление миграции либо установлены границы. Мы увидим работу эфринов и рецепторов Eph при образовании кровеносных сосудов, нейронов и сомитов. Сейчас же рассмотрим подробнее белки Notch и их лиганды.

Сигнальный путь Notch: юстапозиция лигандов и рецепторов в установлении разметки тела

Хотя большинство регуляторов индукции являются диффундирующими белками, некоторые из них остаются связанными с мембранной индуцирующей клеткой. В одном из сигнальных путей, работающих таким образом, клетки, несущие на мембране белки Delta, Jagged или Serrate, активируют соседние клетки, содержащие на мембране белок Notch (Artavanis-Tsakakonas and Muskavitch, 2010). Notch проходит через мембрану насквозь, и его внешняя часть контактирует с белками Delta, Jagged или Serrate на соседней клетке. В комплексе с одним из этих лигандов Notch претерпевает конформационные изменения, позволяющие протеазе презенилин-1 отщепить часть его цитоплазматического домена. Отщепленная часть идет в ядро и связывается с неактивным транскрипционным фактором из семейства CSL. Контакт с белком Notch, транскрипционный фактор CSL активирует его гены-мишени (**рис. 4.34**; Lecourtois and Schweisguth, 1998; Schroeder et al., 1998; Struhl and Adachi, 1998). Предполагают, что такая активация идет при участии ацетилтрансферазы гистонов (Wallberg et al., 2002). Таким образом, Notch можно считать связанным с мембраной транскрипционным фактором. При нарушении этой связи Notch (вернее, его часть) отщепляется от мембраны и переходит в ядро (Kopan, 2002).

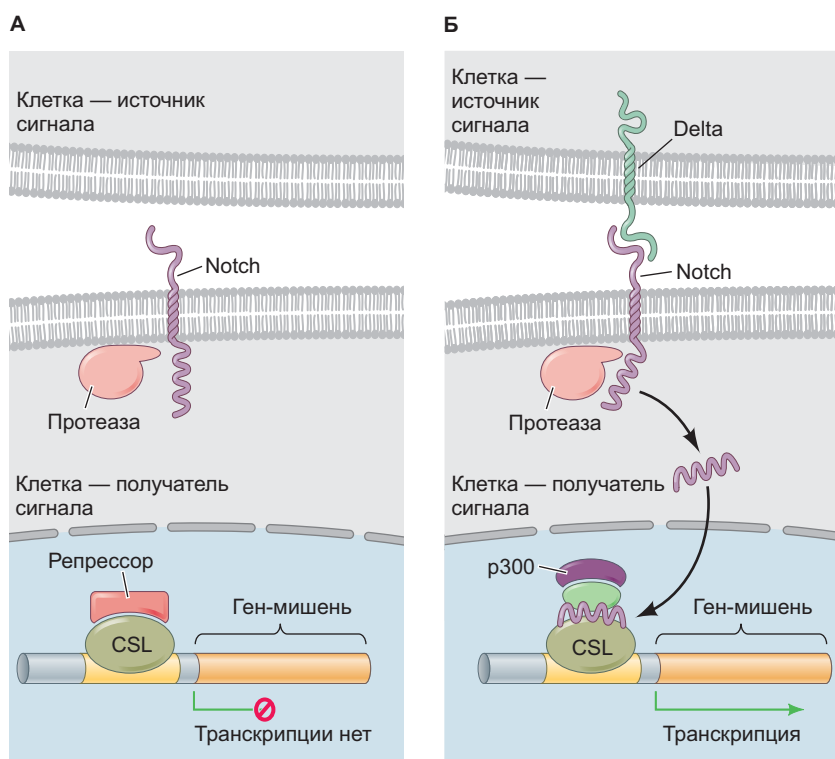


Рис. 4.34. Механизм активности Notch. **А.** До поступления сигнала Notch транскрипционный фактор CSL (например, Suppressor of hairless или CBF1) располагается на энхансерах Notch-зависимых генов. CSL связывает репрессоры транскрипции. **Б.** Модель активации Notch. Лиганд (белок Delta, Jagged или Serrate) на одной клетке связывается с внеклеточным доменом белка Notch на соседней клетке. Связывание вызывает изменение формы внутриклеточного домена Notch, активирующее протеазу. Протеаза расщепляет Notch, позволяя его внутриклеточному домену перемещаться в ядро и связывать транскрипционный фактор CSL. Внутриклеточный домен Notch вытесняет репрессорные белки и связывает активаторы транскрипции, включая ацетилтрансферазу гистонов p300. Далее активированный CSL может транскрибировать гены-мишени. (Рис. А по данным: K. Blaschuk and C. French-Constant, 1998. *Curr Biol* 8: R334–R337; рис. Б по данным: E. H. Schroeder et al., 1998. *Nature* 393: 382–386.)

Notch участвуют в образовании многих органов позвоночных — почек, поджелудочной железы и сердца — и чрезвычайно важен своей рецепторной функцией в нервной системе. В нервной системе и у позвоночных, и у *Drosophila* связывание Delta с Notch указывает получающей сигнал клетке не развиваться в нейральную (Chitnis et al., 1995; Wang et al., 1998). В глазах у позвоночных взаимодействие между Notch и его лигандами регулирует, какие клетки становятся зрительными нейронами, а какие — глиальными клетками (Dorsky et al., 1997; Wang et al., 1998).

Координация паракринной и юкстакринной сигнализации: индукция вульвы у *C. elegans*

Индукция на самом деле происходит на уровне взаимодействия отдельных клеток, и один из лучших примеров тому — образование вульвы у круглого червя *C. elegans*. Примечательно, что в нем, как оказалось, задействованы те же пути передачи сигнала, что используются при образовании рецепторов сетчатки у *Drosophila*; различаются лишь их мишени на уровне транскрипционных факторов. В обоих случаях индуктор, подобный эпидермальному фактору роста, активирует сигнальный путь ТКР, приводя к дифференциальной регуляции сигнальной активности Notch-Delta.

Большинство особей *C. elegans* гермафродиты. В начале развития это самцы и их гонады вырабатывают сперматозоиды, хранящиеся для дальнейшего использования. По мере взросления у них развиваются яичники. Яйцеклетки «прокатываются» через область хранения сперматозоидов, оплодотворяются внутри нематоды и затем выходят из тела через вульву (см. гл. 8; Barkoulas et al., 2013). Образование вульвы происходит на личиночной стадии из шести клеток, известных как **клетки-предшественники вульвы**, или КПВ (vulval precursor cells, VPCs). Клетку, соединяющую вышележащую гонаду с клетками-предшественниками вульвы, называют **якорной клеткой** или ЯК (anchor cell, AC) (**рис. 4.35**). ЯК выделяет белок LIN-3, паракринный фактор (схожий с эпидермальным фактором роста млекопитающих, EGF), который активирует сигнальный путь ТКР (Hill and Sternberg, 1992). В случае уничтожения ЯК (или мутации гена *lin-3*) КПВ не образуют вульву и вместо этого становятся частью гиподермы или кожи (Kimble, 1981).

Шесть КПВ под влиянием ЯК образуют **группу эквивалентности**. Каждый ее член компетентен к индукции якорной клеткой и может принять одну из трех линий развития в зависимости от близости к ЯК. Клетка непосредственно под ЯК претерпевает деление, образуя центральные клетки вульвы.

Две клетки по бокам от центральной делятся, становясь латеральными клетками вульвы, в то время как три наиболее удаленные от ЯК клетки становятся гиподермальными. В случае разрушения ЯК все шесть клеток группы эквивалентности делятся лишь однажды и вносят вклад в гиподермальную ткань. В случае разрушения трех центральных КПВ три внешние клетки, в норме образующие гиподерму, вместо этого порождают клетки вульвы.

LIN-3, выделяемый из ЯК, создает градиент концентрации, в силу чего ближайшие к ЯК КПВ (такие как клетка P6.p) получают максимальную концентрацию LIN-3 и образуют центральные клетки вульвы. Две прилежащие к ним КПВ (P5.p и P7.p) получают меньшее количество LIN-3 и становятся латеральными клетками вульвы. Наиболее удаленные от ЯК КПВ не получают достаточно LIN-3 для развития эффекта, поэтому становятся гиподермальными (Katz et al., 1995).

NOTCH-DELTA И ЛАТЕРАЛЬНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ

Мы обсудили рецепцию EGF-подобного сигнала LIN-3 клетками группы эквивалентности, образующими вульву. Однако, до того как произойдет эта индукция, более раннее взаимодействие формирует ЯК. Образование ЯК идет с участием *lin-12*, гомолога гена *Notch* у *C. elegans*. У гермафродитов дикого типа *C. elegans* потенциалом к образованию ЯК обладают две прилежащие клетки, Z1.ppp и Z4.aaa. Они взаимодействуют таким образом, что одна из них становится ЯК, а другая — предшественником ventральной ткани матки. У мутантов с утратой функции *lin-12* обе клетки становятся ЯК, в то время как при мутациях с усилением функции — ventральными предшественниками матки (Greenwald et al., 1983). Исследования с применением генных мозаик и разрушения клеток показали, что это происходит на второй стадии личиночного развития, и работа гена *lin-12* нужна только в клетке, которая должна стать ventральным предшественником матки. Будущая ЯК в нем не нуждается. Как предположили Сейду и Гринвальд (1989) и затем показали с помощью трансгенной локализации *lacZ* (Wilkinson et al., 1994), изначально эти две клетки синтезируют как сигнал к дифференцировки в матке (белок LAG-2, гомолог Delta), так и рецептор данной молекулы (белок LIN-12, гомолог Notch).

В определенный момент в ходе развития личинки клетка, выделяющая больше LAG-2, вызывает в соседней клетке уменьшение производства этого сигнала дифференцировки и увеличение производства LIN-12. Клетка, производящая больше LAG-2, становится ЯК, а клетка, получающая сигнал через белок LIN-12, становится ventральным предшественником матки (**рис. 4.36**). Считается, что эти две клетки детерминируют друг друга до начала соответствующих

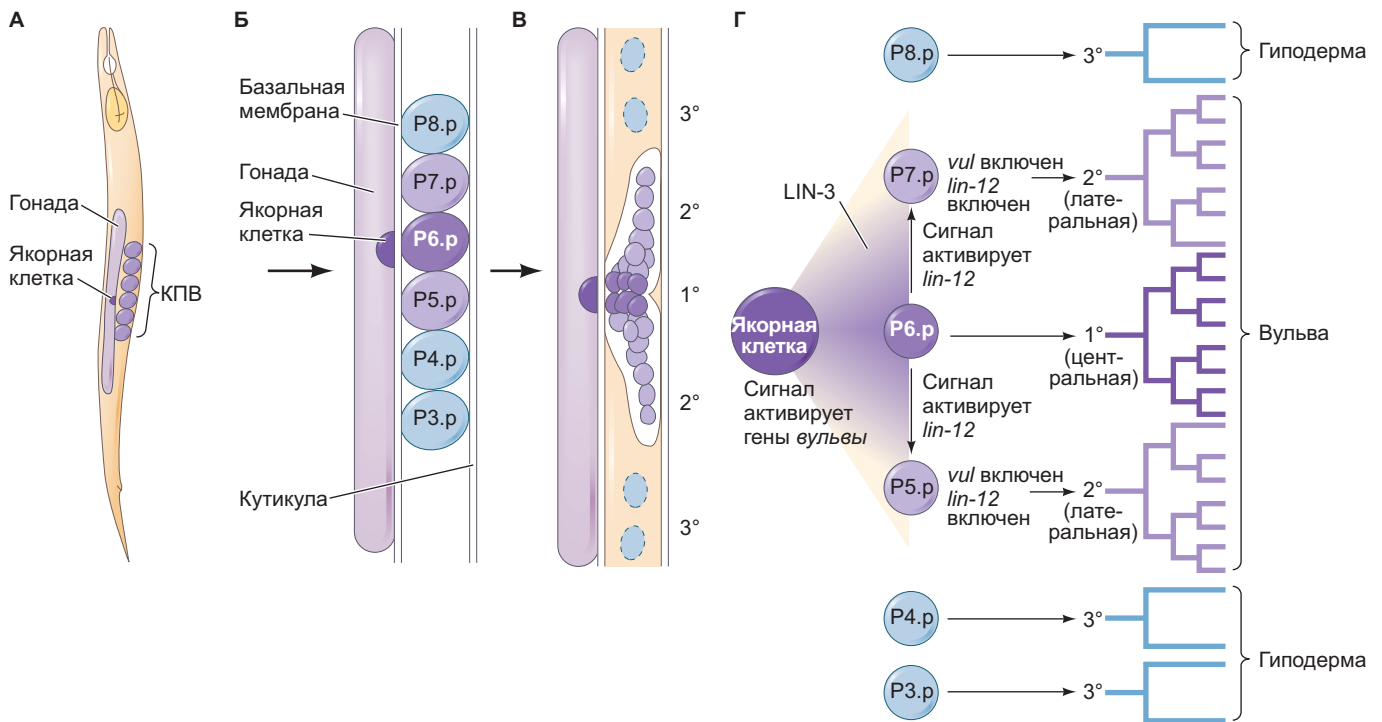
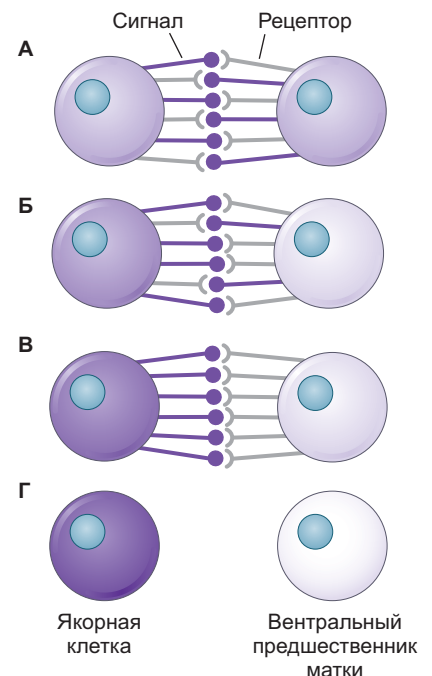


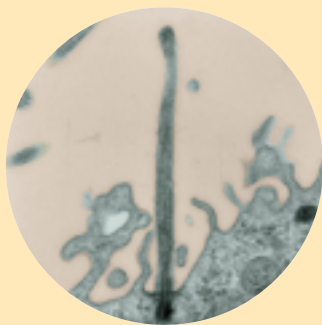
Рис. 4.35. Клетки-предшественники вульвы (КПВ) и их потомки у *C. elegans*. **А.** Расположение гонады, якорной клетки и КПВ у личинки второй стадии развития. **Б, В.** Положение якорной клетки относительно шести КПВ и далее их клонов. Первичные (1°) линии дают центральные клетки вульвы, вторичные (2°) становятся латеральными клетками вульвы, а третичные (3°) образуют гиподермальные клетки. **В.** Схема вульвы у личинки четвертого возраста. Кругами обозначено положение ядер. **Г.** Модель детерминации клеточных линий вульвы у *C. elegans*. Сигнал LIN-3 из якорной клетки вызывает детерминацию клетки Р6.р к образованию линии центральных клеток вульвы (темно-фиолетовый). Под действием более низких концентраций LIN-3 клетки Р5.р и Р7.р образуют линии латеральных клеток вульвы. Клетка Р6.р (центральная линия) также выделяет юстакринный сигнал ближнего действия, индуцирующий активацию в соседних клетках белка LIN-12 (Notch). Этот сигнал препятствует образованию линии центральных клеток вульвы из клеток Р5.р и Р7.р. (По данным: W. S. Katz and P. W. Sternberg, 1996. *Semin Cell Dev Biol* 7: 175–183.)

Рис. 4.36. Модель образования двух типов клеток (якорной клетки и вентрального предшественника матки) из двух эквивалентных клеток (Z1. ppp и Z4. aaa) у *C. elegans*. **А.** Вначале клетки эквивалентны и выделяют флуктуирующие количества сигнала и рецептора. Считается, что ген *lag-2* кодирует сигнал, а ген *lin-12* кодирует рецептор. Рецепция сигнала снижает выработку LAG-2 (Delta) и повышает выработку LIN-12 (Notch). **Б.** Стохастическое (случайное) событие приводит к тому, что одна из клеток вырабатывает больше LAG-2 в определенный критический момент, что далее стимулирует выработку LIN-12 в соседней клетке. **В.** Это различие усиливается, поскольку клетка, производящая больше LIN-12, вырабатывает меньше LAG-2. В итоге одна клетка поставляет сигнал LAG-2, а вторая улавливает его. **Г.** Производящая сигнал клетка становится якорной клеткой, а получающая сигнал клетка становится вентральным предшественником матки. (По: G. Seydoux and I. Greenwald, 1989. *Cell* 57: 1237–1245.)



событий дифференцировки. Когда LIN-12 вновь используется при образовании вульвы, его активируют *delta*-подобные гены, экспрессируемые первичной линией вульвы, для того чтобы предотвратить развитие фенотипа центральной вульвы у клеток вторичной линии (Chen and Greenwald, 2004; см. рис. 4.35). Таким образом, принятие решения «ЯК/вентральный

предшественник матки» иллюстрирует два важных аспекта детерминации в паре исходно эквивалентных клеток. Исходное различие между клетками, во-первых, обусловлено случаем; во-вторых, усиливается за счет обратной связи. Механизм ограничения направления развития прилежащих клеток с участием Notch-Delta называют **латеральным ингибированием**.



Из: A. Alvarez-Buylla et al., 1998.
J Neurosci 18: 1020–1037

О фотографии в начале главы

Что это, клеточная антенна? Если так, какова ее задача? Общение между клетками! На этом изображении показана первичная ресничка на нейронной стволовой клетке в мозге — структура, которая фактически используется как антенна, позволяющая клетке получать сигналы из окружающей среды. Мы обсудили ведущую роль избранных сигнальных белков, передающих огромное количество информации о положении, адгезии, миграции клеток и установлении их идентичности. Механизмы клеточной коммуникации возможны посредством: первичной реснички, показанной на этом изображении; потенциального охвата цитонемами, способного изменить наше понимание доставки морфогенов; модификаций и инструкций со стороны внеклеточного матрикса; физических свойств клеточной адгезии, разделяющих разные клетки и регулирующих размер органов.

4

Коротко

Межклеточная коммуникация

1. Межклеточная коммуникация может происходить между клетками, находящимися в непосредственном контакте друг с другом (юстакринная сигнализация), или на расстоянии путем выделения клетками белков во внеклеточный матрикс (паракринная сигнализация).
2. Отделение клеток одного типа от другого происходит в силу различий на уровне клеточной мембраны.
3. Мембранными структурами, отвечающими за сортировку клеток, часто являются белки кадгерина, молекулы клеточной адгезии, которые меняют поверхностное натяжение слипающихся клеток. Кадгерина могут вызывать разделение клеток на основании как количественных (различное количество кадгерина), так и качественных (разные типы кадгерина) различий. Кадгерина, по-видимому, играют решающую роль в ходе ряда морфологических изменений.
4. Внеклеточный матрикс служит источником сигналов, а также регулятором того, сколько сигналов может быть выделено клетками, влияя на их дифференцировку и миграцию.
5. Внеклеточный матрикс включает такие компоненты как протеоглики (например, гепарансульфатсодержащие и хондроитинсульфатсодержащие протеоглики), гликопротеины (например, фибронектин и ламинин) и белки (например, коллаген).
6. Клетки используют трансмембранные молекулы адгезии интегрины для прикрепления к компонентам внутриклеточного матрикса; внутри клетки интегрины крепятся к цитоскелету; таким образом, интегрины *интегрируют* внеклеточный и внутриклеточный каркасы, позволяя им действовать совместно.
7. Миграция клеток происходит с участием изменений в актиновом цитоскелете. Изменениями могут руководить внутренние инструкции (из ядра) или внешние (например, из внеклеточного матрикса).
8. Клетки могут переходить из эпителиального состояния в мезенхимное. Эпителио-мезенхимный переход (EMT) включает серию изменений, участвующих в распространении клеток нервного гребня и образовании клеток сомитов позвоночных. Во взрослом организме EMT участвует в заживлении ран и метастазировании опухолей.
9. В индукционных взаимодействиях участвуют индуцирующая и воспринимающая ткани. Способность отвечать на индукционные сигналы зависит от компетенции воспринимающих клеток.
10. Образование органов зависит от каскадов индукционных событий.
11. Индуцирующие клетки выделяют паракринные факторы. Факторы связываются с рецепторами на клеточной мембране компетентных воспринимающих

клеток. Компетенцией называют способность связывать индукторы и отвечать на них, и зачастую она сама является результатом более ранней индукции. Компетентные клетки отвечают на паракринные факторы посредством путей передачи сигнала.

12. Морфогены — это секретируемые сигнальные молекулы, которые в зависимости от концентрации по-разному влияют на экспрессию генов.
13. Многие паракринные факторы относят к одному из четырех основных семейств: семейству фактора роста фибробластов (FGF), семейству Hedgehog, семейству Wnt и суперсемейству TGF β , включающему Activin, BMP, Nodal и Vg1.
14. Пути передачи сигнала начинаются с того, что паракринный или юстакринный фактор вызывает конформационное изменение своего мембранного рецептора. Новая форма может приводить к появлению ферментативной активности у цитоплазматического домена рецепторного белка. Активность позволяет рецептору фосфорилировать другие цитоплазматические белки. В итоге каскад возникших реакций активирует транскрипционный фактор (или набор факторов), который активирует или подавляет активность определенных генов.
15. Клеточная поверхность тесно связана с клеточной сигнализацией. Протеогликаны и другие мембранные компоненты облегчают или ограничивают диффузию паракринных факторов.
16. Гормон ауксин является основным морфогеном растений. Принципиальная роль, которую он играет

в нормальном морфогенезе эмбриона, консервативна у разных видов растений.

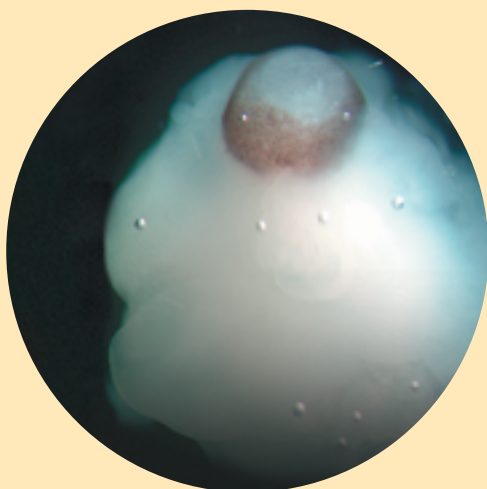
17. Передача сигнала ауксина происходит через отрицательную регуляцию ингибитора сигнального пути, так же как сигнальная активность Hedgehog и Wnt у животных.
18. Асимметричное расположение выходных переносчиков PIN на избранных частях растительных клеток служит для направления тока ауксина в растении. Образующееся в результате ступенчатое распределение концентрации ауксина дифференциально регулирует статус клеток вдоль апикально-базальной оси.
19. Специализированные участки клеточной поверхности, включая первичную ресничку, могут концентрировать рецепторы паракринных факторов и белки внеклеточного матрикса. Недавно открытые выросты типа филоподий, названные цитонемами, могут участвовать в переносе морфогенов между клетками, выделяющими сигнал и отвечающими на него, и быть важным компонентом сигнальной активности клеток.
20. Юстакринная сигнализация включает локальные белковые взаимодействия между рецепторами. Примером служит сигнальный путь Notch-Delta, определяющий направление развития посредством латерального ингибирования, например в случае образования двух различных клеточных типов (якорной клетки и клетки вентрального предшественника матки) из двух исходно эквивалентных клеток эмбриона *C. elegans*.

Стволовые клетки:

НИШИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ ПОТЕНЦИАЛ

5

Это действительно глаз и мозг
в чашке Петри?



Из: М. А. Lancaster et al., 2013.
Nature 501: 373–379

Мы рассмотрели поэтапное развитие клеток через спецификацию, коммиттирование и, наконец, дифференцировку. Данные события обусловлены межклеточными взаимодействиями и регуляцией экспрессии генов, а стволовые клетки — лучший объект для наблюдения за этими сложными процессами.

Стволовые клетки способны к делению и самовоспроизведению, кроме того, они дают потомство, способное к специализации в более дифференцированные клеточные типы. Иногда под понятием «стволовые клетки» подразумевают недифференцированные клетки, исходя из их высокой способности к пролиферации. Существует *множество* типов стволовых клеток, при этом их статус «недифференцированные» действительно определяет их способность к делению и резистентность к созреванию в ткани постмитотических производных. Благодаря тому, что стволовые клетки способны производить неограниченные популяции дочерних клеток, вступающих в пролиферацию и дифференцировку, они обладают огромным потенциалом не только для изучения развития человека, но и для преобразования современной медицины.

В настоящее время существует несколько разделов биологии развития, способных конкурировать со стволовыми клетками в скорости получения новых знаний. В этой главе мы разберем фундаментальные вопросы, касающиеся стволовых клеток. Каковы механизмы, управляющие их делением, самовоспроизведением и дифференцировкой? Где находятся стволовые клетки и как они отличаются в эмбрионе, взрослом организме или в культуре? Как ученые и врачи используют стволовые клетки для исследований и лечения болезней?

Концепция стволовой клетки

Клетка является стволовой, если способна делиться с целью воссоздания копии самой себя (процесс называют **самовоспроизведением**), причем дочерняя клетка может перейти к дальнейшему развитию и дифференцировке. Соответственно, она обладает возможностью, или **потенцией**, к воспроизведению различных типов дифференцированных клеток.

Деление и самовоспроизведение

В ходе деления стволовой клетки возникают дочерние клетки, способные созревать до терминально дифференцированного клеточного типа. Существует симметричное и несимметричное клеточное деление. Если стволовая клетка делится симметрично, она производит либо две новые стволовые клетки, либо две клетки, коммитированные к дальнейшей дифференцировке, в результате чего, соответственно, происходит увеличение или сокращение существующей популяции стволовых клеток. В то же время асимметричное деление клетки стабилизирует пул стволовых клеток, так как обеспечивает появление дочерних, идущих по пути дифференцировки. Стратегию, при которой формируется два типа клеток (стволовые и развивающиеся коммитированные клетки)

при каждом делении, называют **асимметричным делением одной стволовой клетки**, и оно встречается во многих типах стволовых клеток (рис. 5.1А).

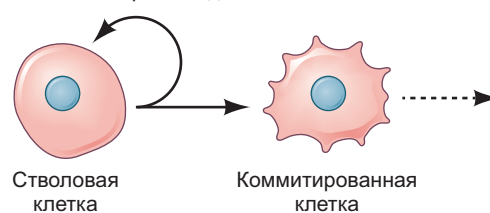
Альтернативным (но не взаимоисключающим) способом сохранения клеточного гомеостаза является принцип **популяционной асимметрии** при делении стволовых клеток. Часть стволовых клеток больше предрасположена к производству дифференцированных прогениторных клеток, что компенсирует другая группа стволовых клеток, делящихся симметрично. В результате поддерживается пул стволовых клеток в пределах данной популяции (рис. 5.1Б).

Потенции определяют типы стволовых клеток

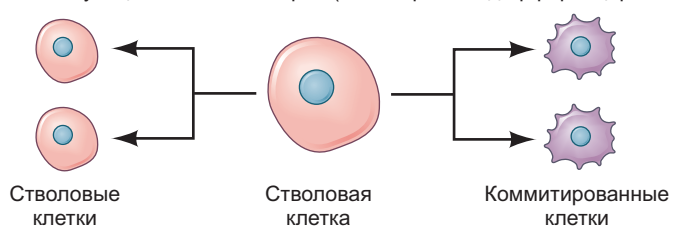
Многообразие типов клеток, которые стволовые клетки могут произвести *in vivo*, зависит от их природных потенций. Стволовая клетка, способная дать клетки всех типов, является тотипотентной. В таких организмах, как гидра, каждая клетка — **тотипотентна** (см. гл. 22). У млекопитающих только оплодотворенная яйцеклетка и первые 4–8 бластомеров остаются тотипотентными, т. е. могут произвести как обе линии зародышевых клеток (формирующих клетки тела и половые клетки), так и линии внезародышевых клеток (которые формируют плаценту, амнион,

Рис. 5.1. Общее определение стволовой клетки. **А.** Основное представление о стволовой клетке заключается в том, что она может производить как стволовые клетки, так и клетки, коммитированные к дальнейшей дифференцировке. Этот процесс называют асимметричным делением. **Б.** Популяцию стволовых клеток поддерживает и асимметрия популяции. Стволовая клетка способна к симметричному делению, что приводит к образованию двух новых стволовых клеток (следовательно, происходит увеличение пула стволовых клеток) или двух коммитированных клеток (происходит сокращение пула). Эти явления называют симметричным обновлением или симметричной дифференцировкой соответственно. **В.** Во многих органах линии стволовых клеток берут начало от мультипотентной стволовой клетки (она способна к формированию нескольких типов клеток), далее формируется коммитированная клетка, способная дать один или всего несколько типов клеток-предшественников, которые делятся несколько раз с последующим формированием определенных типов клеток

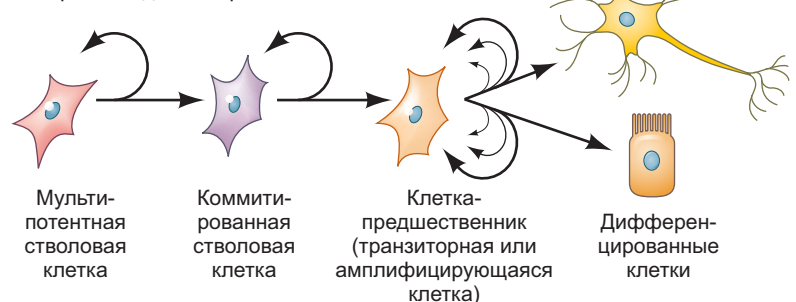
А Асимметричное деление стволовой клетки



Б Популяционная асимметрия (симметричная дифференцировка)



В Происхождение взрослых стволовых клеток



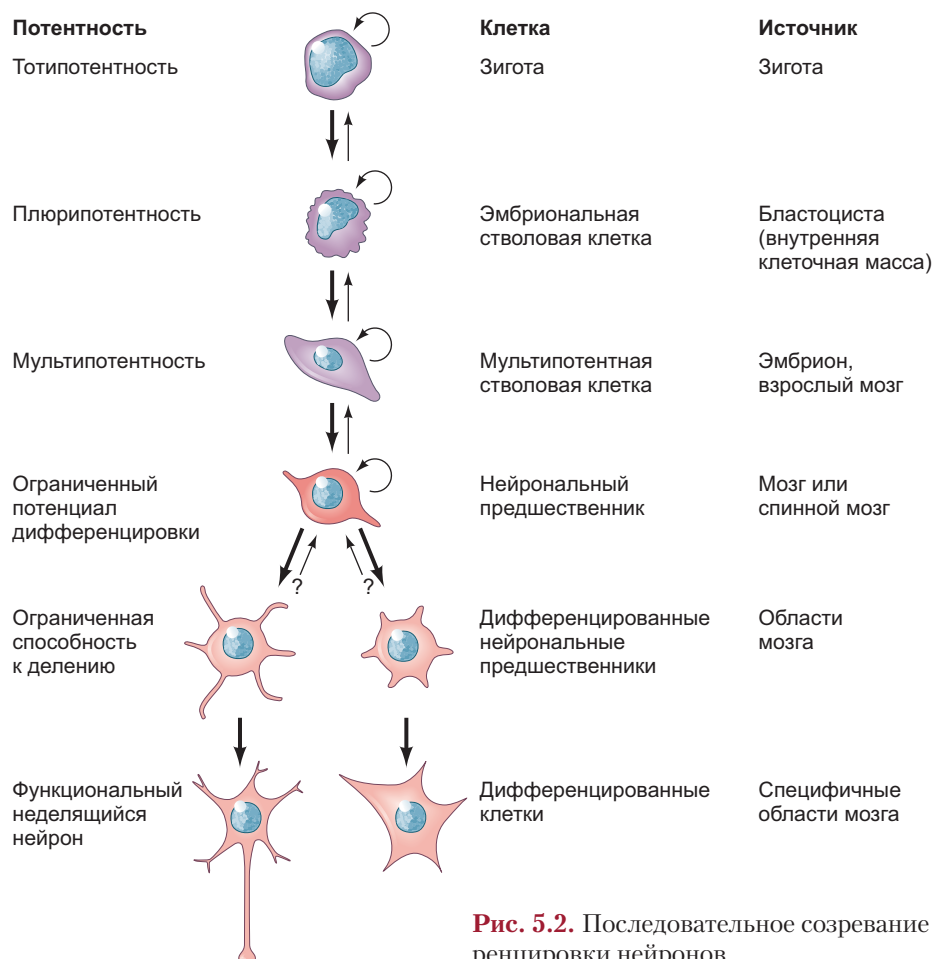


Рис. 5.2. Последовательное созревание стволовых клеток на примере дифференцировки нейронов

аллантаис и желточный мешок) (рис. 5.2). Вскоре после восьмиклеточной стадии эмбрион млекопитающих формирует внешний слой клеток (он станет зародышевой частью плаценты) и внутреннюю клеточную массу, которая сформирует эмбрион. Клетки внутренней клеточной массы **плюрипотентны**, т. е. способны произвести все клетки эмбриона. Если извлечь из эмбриона внутреннюю клеточную массу, то при культивировании *in vitro* она сформирует популяцию плюрипотентных **эмбриональных стволовых клеток (ЭСК)**.

Пока популяции клеток в каждом слое эмбриона увеличиваются и дифференцируются, внутри формирующихся тканей сохраняются присутствующие в них стволовые клетки. Данные клетки **мультипотентны**, их функция заключается в том, чтобы производить клетки с определенными свойствами, характерными для ткани, в которой они находятся (рис. 5.1В и 5.2). От эмбрионального кишечника до тонкого кишечника взрослого организма или от нервной трубки до взрослого мозга мультипотентные стволовые клетки играют ключевую роль в процессах органогенеза у эмбриона и регенерации тканей взрослого организма. Некоторые органы **взрослого организма содержат стволовые клетки**, которые в большинстве случаев мультипотентны. Помимо того что существуют гемопоэтические клетки, необ-

ходимые для производства всех клеток крови, биологи обнаружили стволовые клетки в эпидермисе, мозге, мышцах, зубах, кишечнике, наряду с другими областями взрослого организма. В отличие от плюрипотентных, мультипотентные стволовые клетки или стволовые клетки взрослого организма в культуре дают не только клетки строго определенного типа, но и имеют ограниченное число поколений. Ограниченное самообновление стволовых клеток взрослого организма может быть связано со старением (Asumda, 2013).

Когда мультипотентная стволовая клетка делится асимметрично, она производит дочернюю клетку, которая проходит преобразование через **клетку-предшественницу** или **транзиторно-амплифицирующую клетку**, как это было показано на клетках крови, спермы или нейронах (см. рис. 5.1В и 5.2). Клетки-предшественники не способны к неограниченному самовоспроизведению; точнее, они могут поделиться только несколько раз перед дифференцировкой (Seaberg, van der Kooy, 2003). Несмотря на ограничения, эта пролиферация служит для **расширения** пула предшественников перед их окончательной дифференцировкой. Клетки в пределах пула предшественников могут дифференцироваться, проходя разные, но родственные пути спецификации. Например, гемопоэтические стволовые клетки производят клет-

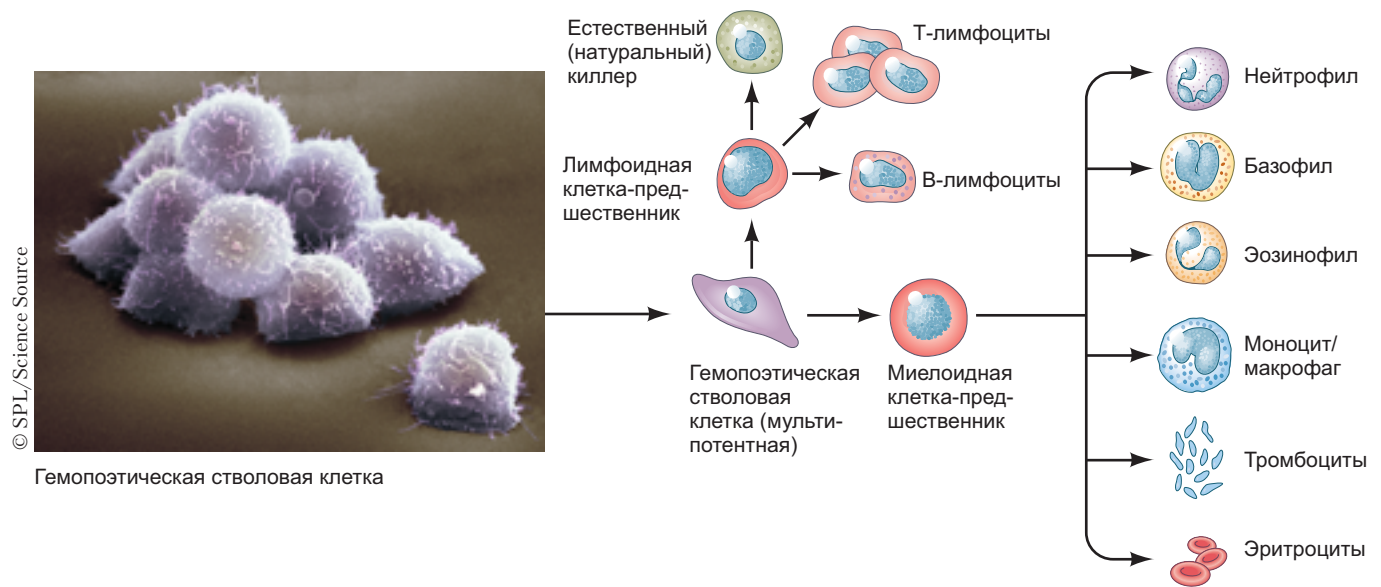


Рис. 5.3. Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). Данные мультипотентные стволовые клетки производят клетки крови в течение всей жизни. ГСК из костного мозга человека (на фотографии) могут делиться и производить больше ГСК. Кроме того, потомки ГСК способны становиться лимфоидными клетками-предшественниками (которые делятся и производят клетки приобретенного иммунитета) или миелоидными клетками-предшественниками (которые становятся предшественниками других клеток крови). Путь дифференцировки, проходимый каждой клеткой, регулирует микроокружение ГСК или их ниша (см. рис. 5.16)

ки-предшественники крови и лимфоидных клеток, которые далее развиваются до дифференцированных клеток крови, таких как эритроциты, нейтрофилы и лимфоциты (клетки иммунного ответа; **рис. 5.3**). Еще одно понятие, **клетка-предшественник**, широко используют для обозначения исходных типов клеток (тоже стволовых или клеток-предшественников) конкретной линии; кроме того, к нему часто обращаются, если характерные признаки не важны или неизвестны (Tajbakhsh, 2009). Часть стволовых клеток взрослого организма, такие как сперматогонии, относят к **унипотентным**, так как их функция заключается в производстве только одного типа клеток, в данном случае сперматозоидов. Точный контроль деления и дифференцировки разнообразных типов стволовых клеток необходим для построения эмбриона, а также для поддержания и регенерации тканей во взрослом организме.

Регуляция стволовых клеток

Выше обсуждалось, что основные функции стволовых клеток касаются самовоспроизведения и дифференцировки. Но как происходит регуляция стволовых клеток между этими различными состояниями, чтобы обеспечить структуру и морфогенетические потребности эмбриона и взрослой ткани? В большой степени регуляция зависит от микроокружения стволовой клетки, которое называют **нишей стволовой**

клетки (Schofield, 1978). На сегодняшний день все больше доказательств, что все типы тканей обладают своей особой нишей стволовых клеток, и, несмотря на значительные различия между структурами ниш в отдельных тканях, существует несколько общих принципов регуляции стволовых клеток, применимых для всех типов микроокружения. Среди этих принципов *внеклеточные* механизмы, приводящие к *внутриклеточным* изменениям, регулирующие поведение стволовой клетки (**рис. 5.4**). Выделяют следующие внеклеточные механизмы:

- **Физические механизмы** воздействия, включающие в себя структурные и адгезионные факторы внеклеточного матрикса, которые поддерживают клеточную структуру ниши. Разница во взаимодействиях клетка — клетка и клетка–матрикс, так же как и плотность расположения клеток внутри ниши, способны менять механические напряжения, влияющие на поведение стволовой клетки.
- **Химическая регуляция** стволовых клеток в виде белков, секретируемых окружающими клетками, заключается во влиянии на статус стволовой клетки и дифференцировку предшественников с помощью эндокринных, паракринных или юстакринных механизмов (Moore, Lemischka, 2006; Jones, Wagers, 2008). В большинстве случаев данные сигнальные факторы поддерживают стволовую клетку в некомпитированном состоянии. Как только стволовые клетки отдаляются от ниши, они становятся недоступными для факторов и переходят к дифференцировке.

Различают следующие внутриклеточные регуляторные механизмы:

- *Регуляция с помощью цитоплазматических факторов*, распределение которых происходит в ходе цитокинеза. Когда стволовая клетка делится, факторы, определяющие направление ее развития, избирательно переходят к одной дочерней клетке (асимметричное деление) либо равномерно распределяются между дочерними клетками (симметричное деление).
- *Транскрипционная регуляция*, происходящая с помощью сети транскрипционных факторов. Факторы поддерживают состояние покоя или пролиферацию стволовых клеток и способствуют созреванию дочерних клеток в соответствии с их статусом.
- *Эпигенетическая регуляция*, или регуляция на уровне хроматина. Структура хроматина может изменяться (при помощи белков гистонов); доступность хроматина определяет экспрессию генов, что влияет на состояние стволовой клетки.

Внутриклеточные механизмы, характерные для стволовых клеток, стоят ниже в каскаде внеклеточных стимулов, исходящих от ниши. Так же важно, впрочем, развитие стволовой клетки в пределах ниши. Далее представлено описание наиболее известных ниш стволовых клеток, освещается их происхождение и специфические вне- и внутриклеточные механизмы, важные для регуляции состояния стволовой клетки.

Плюрипотентные клетки в эмбрионе

На клеточном уровне существует много общих черт функционирования стволовых клеток у животных и растений. Мы рассмотрим типы стволовых клеток, участвующих в построении эмбриона, а далее обсудим многообразие стволовых клеток, существующих во взрослом организме. Примечательно, что контраст между функциями стволовых клеток эмбриона и взрослого организма указывает на одно из ключевых различий между растениями и животными: сохранение или недостаток тотипотентных стволовых клеток в течение жизни. В частности, ранняя бластоциста млекопитающих содержит **внутреннюю клеточную массу** (ВКМ), состоящую из плюрипотентных стволовых клеток. Они дают начало всем типам клеток тела, но позже эти клетки дифференцируются в клетки с более ограниченными свойствами в пределах каждого зародышевого листка. Ранний эмбрион растения формирует две группы тотипотентных стволовых клеток или **клеток меристемы** (initial cells), одна из которых находится на верхней части стебля, а другая — в корневой области. Данные группы клеток называют апикальной меристемой стебля и апикальной меристемой корня. Самое примечательное отличие от стволовых клеток животных заключается в том, что меристема существует в течение всей жизни растения. Когда зародыш прорастает, верхушечная и корневая

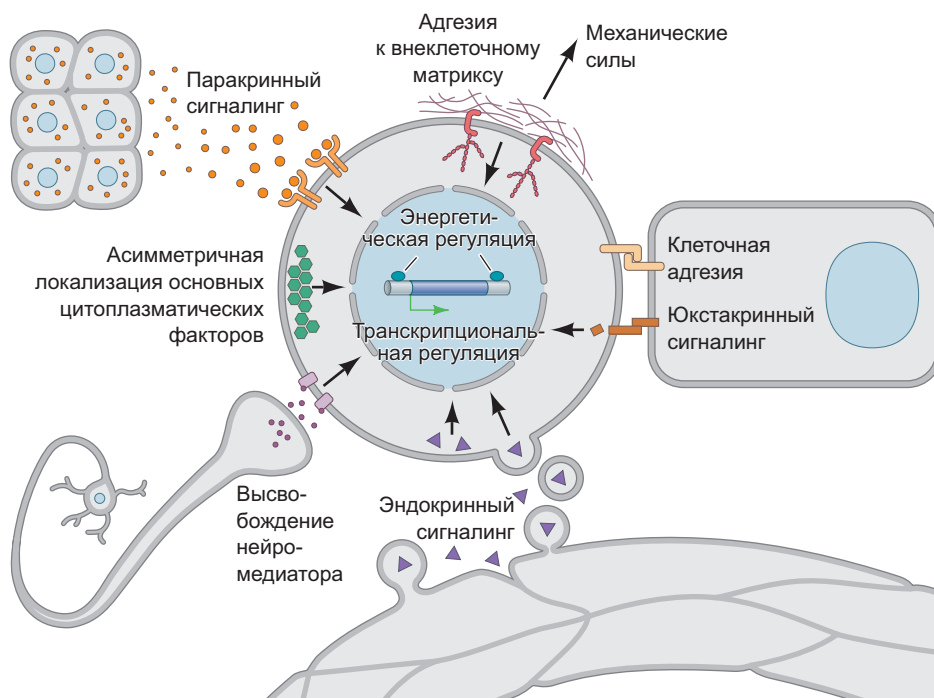


Рис. 5.4. Делиться или не делиться: механизмы регуляции стволовых клеток. На схеме показаны общие внутренние и внешние механизмы, контролирующие состояние покоя, пролиферацию или дифференцировку стволовой клетки

меристемы необходимы для формирования побегов (стеблей и листьев). В гл. 3 мы обсудили, что апикальная меристема стебля может переходить в **меристему соцветия**, которая формирует репродуктивные ткани (цветки) вместо листьев.

Почему у растений тотипотентные стволовые клетки сохраняются в течение всей жизни, а у животных нет? Чтобы ответить на этот вопрос, мы рассмотрим механизм образования меристем у эмбрионов растений, а затем переключим свое внимание на путь развития внутренней клеточной массы млекопитающих.

Клетки меристемы у эмбриона *Arabidopsis thaliana*

Все подземные и надземные части растения формируются благодаря апикальной меристеме стебля и корня. Самое удивительное заключается в том, что растительные клетки не способны к движению в течение развития организма, поэтому происхождение меристем можно довольно точно проследить до ранней эмбриональной стадии (**рис. 5.5А–Г**). Характерное время развития и формирования меристем можно определить по экспрессии ранних генов ме-

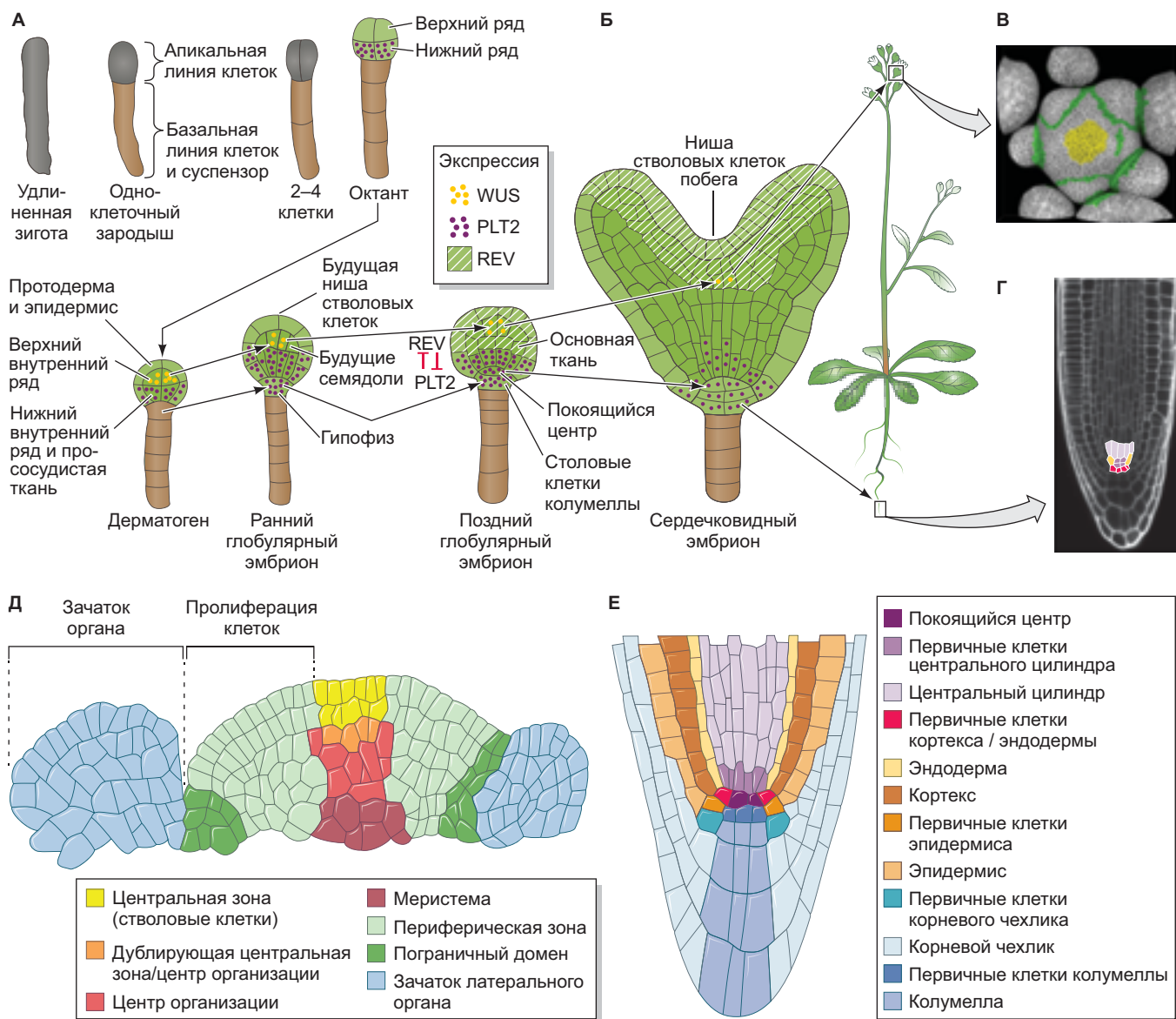


Рис. 5.5. Меристема растений. **А, Б.** Эмбриональное развитие со стадии зиготы до сердцевидной стадии эмбриона *Arabidopsis thaliana*. Апикальная меристема стебля дает начало листьям и цветкам, а апикальная меристема корня дает начало корню. **В.** Вид сверху на апикальную меристему стебля. Центральная зона и пограничные домены обозначены желтым и зеленым цветом соответственно, они соотносятся с частями, обозначенными тем же цветом на поперечном срезе на рис. **Д.** Аналогично на микрофотографии створовых клеток апикальной меристемы корня (**Г**) цвета соответствуют цветам на рис. **Е**

ристом, таким как фактор транскрипции WUSCHEL (WUS) вкупе с его паралогом *WOX2* и *REVOLUTA* (REV) для меристемы стебля. В то же время члены семейства транскрипционных факторов *PLETHORA* (PLT) были обнаружены в апикальной меристеме стебля, а *PLT2* — в меристеме корня. Клетки в верхнем внутреннем ряду на стадии дерматогена *A. thaliana* формируются благодаря центру организации, экспрессирующему WUS, так же как стволовые клетки стебля в центральном апикальном домене (рис. 5.5Д). Напротив, клетки нижнего ряда на стадии дерматогена экспрессируют *PLT2* и относятся к стволовым клеткам корня (рис. 5.5Е) (Heidstra, Sabatini, 2014; Zhang et al., 2017).

ПОДДЕРЖАНИЕ ТОТИПОТЕНТНОСТИ В АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЕ КОРНЯ

Развитие *A. thaliana* в пределах семени останавливается, когда эмбрион достигает терминальной стадии развития. Развитие возобновляется, когда условия окружения оптимальны для прорастания и начала фазы неограниченного вегетативного роста. Одна из самых потрясающих особенностей растений реализуется в ходе постэмбрионального периода роста, когда апикальные меристемы стебля и корня поддерживают тотипотентность. Функции меристемы заключаются в соблюдении баланса между пролиферацией, дифференцировкой и поддержанием пула стволовых (первичных) клеток. В связи с таким примечательным свойством многие биотехнологические и фармацевтические компании активно исследуют механизмы, регулирующие тотипотентность стволовых клеток растений.

Для того чтобы лучше проиллюстрировать тонкий баланс функций стволовых клеток растений, мы обратим внимание на процессы, происходящие в апикальной меристеме стебля. Так же как стволовые клетки животных, первичные клетки апикальной меристемы стебля у растений делятся относительно медленно и дают начало таким же первичным клеткам наряду с дочерними клетками-предшественниками (прогениторными клетками), которые постепенно перемещаются в периферийную зону и дифференцируются. Клетки-предшественники, расположенные в пределах периферийной зоны в каждом из трех слоев, будут делиться гораздо быстрее (рис. 5.6А). В двух наиболее апикальных слоях клетки-предшественники сначала подвергаются **антиклинальным делениям**. Это означает, что новые клетки откладываются перпендикулярно поверхности апикальной меристемы. В третьем, более глубоком, слое клетки делятся во всех направлениях, в том числе и в **периклинальном** (новые клетки откладываются параллельно поверхности).

Как вы поймете из этой и многих других глав, действие обратных отрицательных связей обеспе-

чивает устойчивый механизм определения и поддержания конкретного поведения и пути развития клетки. Регуляция тотипотентности в меристеме не исключение (рис. 5.6Б). Для производства клеток-предшественников стволовыми клетками в апикальной меристеме стебля необходима экспрессия и секреция сигнального белка *CLAVATA3* (CLV3). Ниже центральной зоны расположен центр организации, который экспрессирует пионерский регуляторный транскрипционный фактор WUS (Laux et al., 1996; Mayer et al., 1998). WUS передает сигнал в центральную зону и стимулирует экспрессию *CLV3* и установление медленного темпа деления для стволовых клеток. С каждым новым делением клетки-предшественники постепенно перемещаются из центральной зоны в периферическую, где

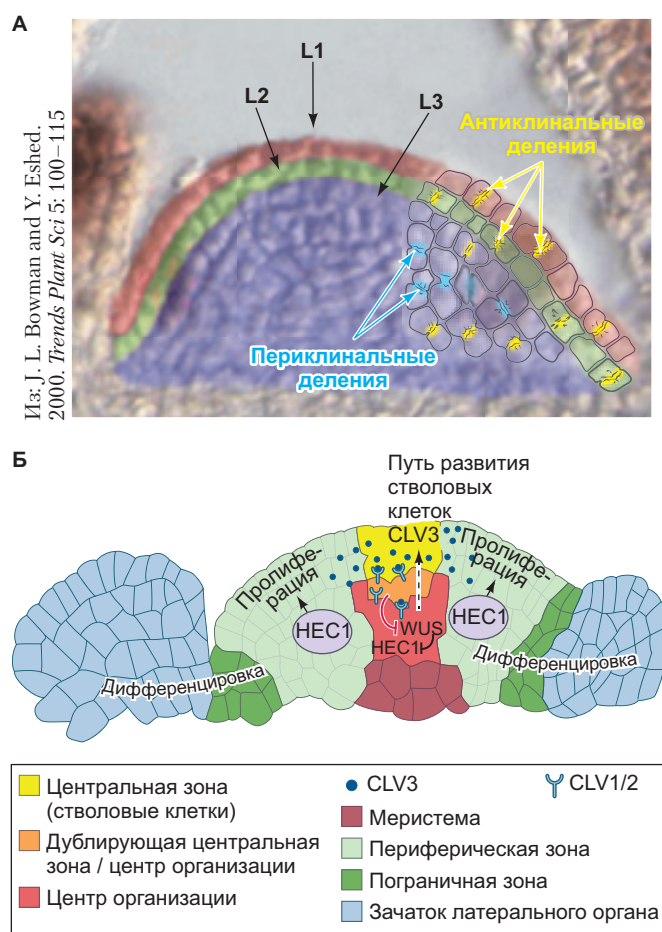


Рис. 5.6. Поддержание пула стволовых клеток в апикальной меристеме стебля. **А.** Продольный срез апикальной меристемы стебля с тремя слоями (L1–L3), окрашенными псевдоцветами. Справа представлены антиклинальные деления в первом и втором слоях клеток и смешанные деления в третьем слое. **Б.** На рисунке изображена отрицательная обратная связь, действующая между центром организации, центральной и периферической зонами. (Рис. А из: Bowman, Y. Eshed, 2000; рис. Б из: C. Gaillochet, J. U. Lohmann, 2015)

Загадки развития

Существует ли у клеток запрограммированная функция «быть стволовой клеткой»? Быть стволовой клеткой — это внутреннее свойство клеток или это свойство, возникающее в результате взаимодействий с нишей стволовых клеток? Ниша создает стволовые клетки? Какой подход вы можете использовать для определения того, какие условия существуют в конкретном органе?

транскрипционный фактор HEC1 повышает пролиферативную активность клеток-предшественников до того момента, пока они не достигнут латерального зачатка органа и не пройдут этап дифференцировки. WUS активно подавляет экспрессию HEC1, таким образом поддерживая особый статус центра организации (Schuster et al., 2014). Вместе с тем, по мере того как концентрация CLV3 растет, данный фактор взаимодействует с рецепторами CLV1 и CLV2 на клеточной мембране в центре организации. Такое взаимодействие запускает сигнальный путь, который подавляет активность WUS, что формирует отрицательную обратную связь, поддерживающую постоянное число первичных клеток в ходе вегетативного развития и развития меристем соцветия и цветков (Somssich et al., 2016; Gaillochet, Lohmann, 2015; Heidstra, Sabatini, 2014).

Клетки внутренней клеточной массы в эмбрионе мыши

У млекопитающих среди всех стволовых клеток наиболее изучены плюрипотентные клетки внутренней клеточной массы (ВКМ). За делением зиготы и формированием морулы процесс кавитации приводит к формированию бластоцисты¹, которая состоит из сферического слоя **трофоэктодермы**, окружающего внутреннюю клеточную массу, и заполненной жидкостью полости, называемой **бластоцелем** (рис. 5.7). В ранней бластоцисте мыши ВКМ состоит примерно из 12 клеток, прикрепленных к трофоэктодерме только с одной стороны (Handyside, 1981; Fleming, 1987). Впоследствии ВКМ сформирует группу клеток, которую называют эпибластом, и слой первичной энтодермы (желточный мешок), отделяющий эпибласт от бластоцеля. Эпибласт дает все типы клеток (около 200) взрослого организма млекопитающих и формирует собственно эмбрион, включая первичные половые клетки (Shevde, 2012), в то время как трофоэктодерма и первичная энтодерма дают начало внезародышевым структурам: хориону, формирующему зародышевую часть плаценты, и желточному мешку (Stephenson et al., 2012; Artus, Chazaud, 2014). Важно, что культивирование клеток ВКМ или эпибласта приводит к получению эмбриональных стволовых

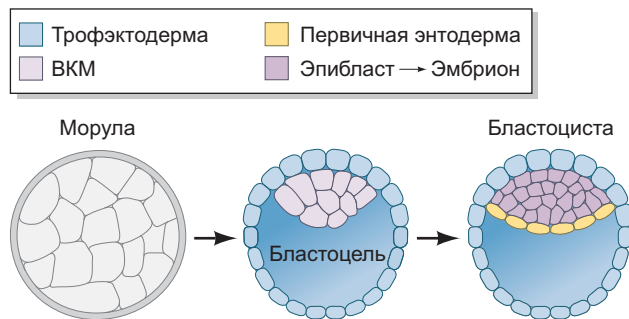


Рис. 5.7. Формирование внутренней клеточной массы (ВКМ, которая в перспективе построит эмбрион) в бластоцисте мыши. Изображены три типа клеток — трофоэктодерма, эпибласт и первичная энтодерма от морулы до бластоцисты

клеток (ЭСК)², сохраняющих тотипотентность и способных дать начало всем клеткам организма (Martin, 1980; Evans, Kaufman, 1981). В отличие от поведения ЭСК в условиях *in vivo*, при определенных методах культивирования ЭСК, по-видимому, способны к бесконечному самовоспроизведению. Свойства и возможность применения ЭСК мы обсудим далее. Здесь акцентируем внимание на бластоцисте млекопитающих, на нише ее собственных стволовых клеток, поддерживающих развитие исключительно клеток эмбрионов позвоночных, которые, по крайней мере, временно плюрипотентны.

МЕХАНИЗМЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ КЛЕТОК ВКМ

Для плюрипотентности ВКМ необходима экспрессия транскрипционных факторов Oct4³, Nanog и Sox2 (Shi, Jin, 2010). Эти три фактора транскрипции необходимы для поддержания некоммитированного статуса, как у стволовых клеток, и функциональной плюрипотентности ВКМ, обеспечивающей возмож-

¹ Это описание обобщенное; не все млекопитающие развиваются одинаково в период ранней бластоцисты. Например, сумчатые не образуют внутреннюю клеточную массу; скорее, они создают сплюснутый слой клеток, называемый плюрибластом, который дает начало эквивалентным эпибласту и гипобласту (см. работу Kuijk с соавторами (2015) для получения дополнительной информации об удивительном расхождении этапов раннего развития между видами).

² Большинство линий ЭСК начинается с кокультуры нескольких клеток из ВКМ, после чего изолированные клетки могут размножаться как клональные линии.

³ Oct4 известен также как Oct3, Oct3/4 и Pou5f1. Мыши с дефицитом Oct4 не могут развиваться после стадии бластоцисты. У них отсутствуют плюрипотентные ВКМ и все клетки дифференцируются в трофоэктодерму (Nichols et al. 1998; Le Bin et al., 2014). Экспрессия Oct4 необходима также для поддержания плюрипотентности производных первичных половых клеток.

ность формирования эпибласта и других ассоциированных типов клеток (Pardo et al., 2010; Artus, Chazaud, 2014; Huang, Wang, 2014). Кроме того, было показано, что экспрессия этих факторов прекращается по мере формирования эпибласта (Yeom et al., 1996; Kehler et al., 2004). Напротив, экспрессия фактора транскрипции *Cdx2* во *внешних* клетках морулы способствует формированию трофоэктодермы и репрессирует развитие эпибласта (Strumpf et al., 2005; Ralston et al., 2008; Ralston et al., 2010).

Каковы же механизмы, регулирующие паттерны экспрессии генов во времени и пространстве в пределах презумптивной ВКМ и трофоэктодермы? Межклеточные взаимодействия создают основу для спецификации и формирования структуры этих частей эмбриона. Во-первых, клеточная полярность вдоль апикально-базальной оси (в данном случае от внешней части к внутренней части эмбриона) создает механизм, с помощью которого симметричные и асимметричные деления обеспечивают появление двух разных типов клеток. Перпендикулярно направленные асимметричные деления вдоль апикально-базальной оси приводят к образованию одной внешней и одной внутренней дочерних клеток, способствуя формированию трофоэктодермы и ВКМ соответственно. Симметричные деления, параллельные апикально-базальной оси, напротив, ведут к равномерному распределению цитоплазматических детерминант между дочерними клетками, приумножая таким образом число клеток в одном слое, будь то трофоэктодерма или ВКМ (рис. 5.8). Подобные типы делений схожи с периклинальными и антиклинальными делениями в меристеме растений (рис. 5.6А).

На стадии морулы факторы асимметрично распределяются вдоль апикально-базальной оси во внеш-

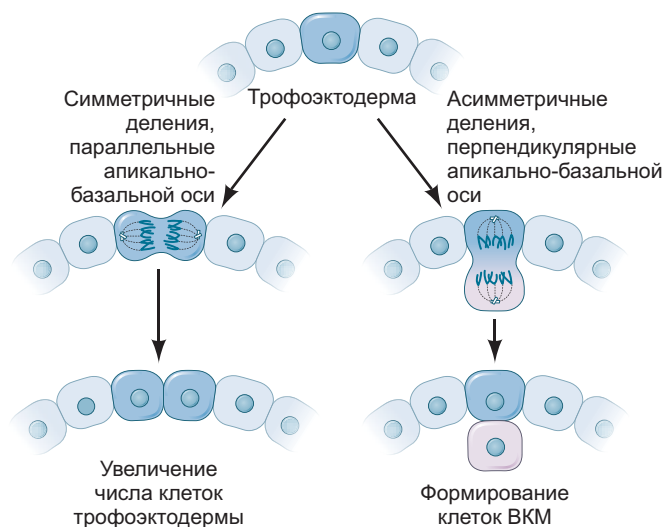


Рис. 5.8. Деление относительно апикально-базальной оси. В зависимости от оси деления клеток трофоэктодермы происходит растяжение слоя клеток трофоэктодермы (слева) или формирование клеток ВКМ (справа)

них клетках презумптивной трофоэктодермы. Эти факторы включают в себя хорошо известные белки из семейств белков дефектного деления PAR (partitioning defective) и атипичных протеинкиназ C (aPKC). Одним из результатов действия PAR является привлечение адгезионных молекул E-кадгерина к базолатеральной мембране, где внешний слой клеток контактирует с клетками ВКМ (рис. 5.9А; см. гл. 4; Stephenson et al., 2012; Artus, Chazaud, 2014). Экспериментально было показано, что удаление E-кадгерина приводит к нарушению как апикально-базальной полярности, так и спецификации клеток ВКМ и трофоэктодермы (Stephenson et al., 2010).

Ниши стволовых клеток у взрослых животных

Многие ткани и органы взрослых организмов содержат стволовые клетки, претерпевающие непрерывное самообновление. В их число входят, в частности, половые клетки разных видов, мозг, эпидермис, волосяные фолликулы, ворсинки кишечника и клетки крови у млекопитающих. Кроме того, мультипотентные стволовые клетки во взрослом организме играют важную роль для животных с высокими способностями к регенерации, таких как гидра, аксолотль и *Danio*. Стволовые клетки взрослого организма должны быть способны к делению в течение длительного времени, к производству дочерних дифференцированных клеток, а также к обновлению пула стволовых клеток. Ниша является «домом» стволовых клеток, она регулирует их самообновление, выживание и дифференцировку потомков, которые в дальнейшем покидают ее. Мы расскажем о наиболее изученных нишах, в число которых входит ниша половых клеток *Drosophila*, а также ниши нейронных, эпителиальных клеток кишки и гемопоэтических стволовых клеток. Безусловно, данный список не является исчерпывающим, но освещает универсальные механизмы, контролирующие развитие стволовых клеток.

Стволовые клетки стимулируют развитие половых клеток в яичнике *Drosophila*

Ооциты *Drosophila* происходят от первичных половых клеток (ППК). Последние находятся в нише овариальных стволовых клеток, и локальная секреция паракринных факторов влияет на самовоспроизведение стволовых клеток и дифференцировку ооцитов, зависящую от концентрации. Формирование яйцеклеток в яичнике взрослой мухи происходит более чем в 12 овариолах, каждая из которых содержит первичные

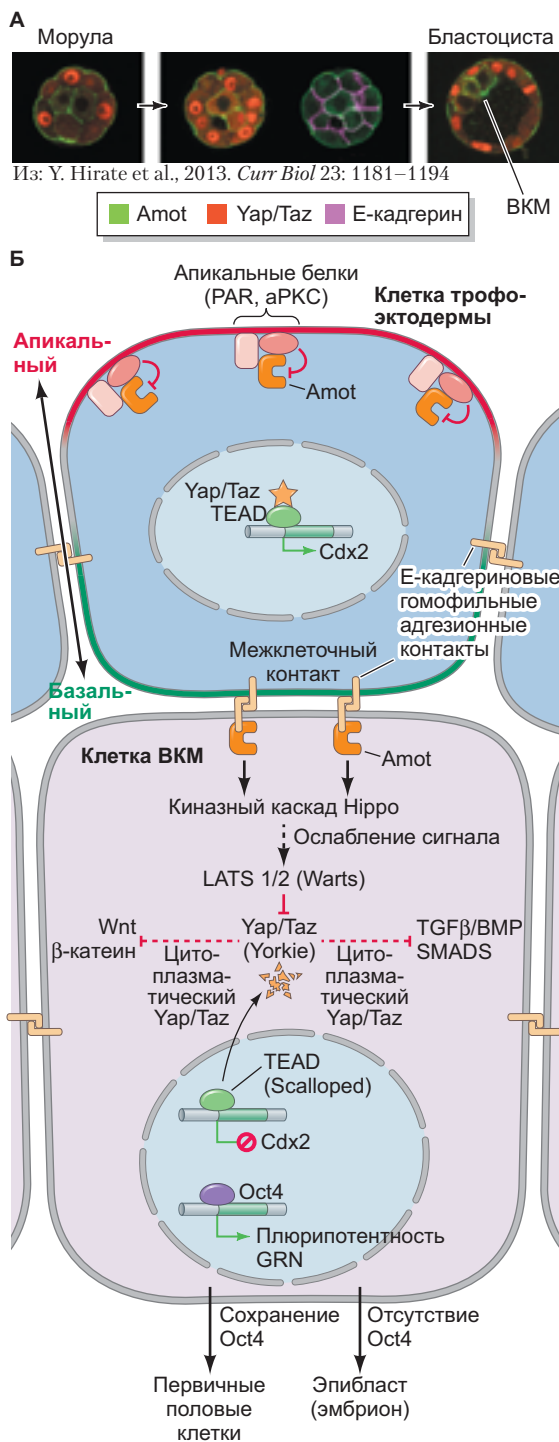


Рис. 5.9. Hippo-сигналинг и формирование ВКМ. **А.** Иммуноцитохимическое окрашивание белков Hippo-каскада Amot (ангиомотин, зеленый цвет) и Yap (красный цвет) совместно с окрашиванием на E-кадгерин от стадии морулы до бластоцисты. Активированный Yap находится в ядрах клеток трофоэктодермы, тогда как E-кадгерин (сиреневый) расположен в местах контакта трофоэктодермы и клеток ВКМ. **Б.** Hippo-сигналинг в клетках трофоэктодермы (верхняя клетка) и в клетках ВКМ (нижняя клетка). Каскад Hippo активируется благодаря связыванию E-кадгерина с Amot, в результате Yap не функционирует в клетках ВКМ. Названия в скобках — гомологи указанных белков у *Drosophila*

половые клетки (обычно две на овариолу) и некоторое количество соматических клеток, создающих нишу. Эту структуру называют гермариумом (Lin, Spradling, 1993). Первичные половые клетки делятся, в ходе данного процесса они самовоспроизводятся и формируют цистобласт так же, как и клетка-предшественник сперматозоида — гониобласт, который будет выходить за пределы ниши стволовых клеток по мере созревания, т. е. за пределы досягаемости регуляторных сигналов, и станет ооцитом, окруженным фолликулярными клетками (рис. 5.10А; Eliazar, Buszczak, 2011; Slaidina, Lehmann, 2014).

Пока ППК находятся в нише стволовых клеток, они контактируют с кэп-клетками. Предшественники половых клеток делятся перпендикулярно по отношению к кэп-клеткам, и одна из дочерних клеток остается связанной с кэп-клеткой с помощью E-кадгериновых контактов, сохраняя свою уникальную способность к самовоспроизведению, в то время как отделившаяся дочерняя клетка начнет дифференцироваться в ооцит (Song, Xie, 2002). Кэп-клетки оказывают влияние на ППК с помощью белков семейства TGFβ, которые активируют сигнальный каскад BMP в ППК, таким образом предотвращая дифференцировку ППК (рис. 5.10Б). Компоненты межклеточного матрикса, такие как коллаген и протеогликангепарансульфат, ограничивают распространение белков TGFβ, и только связанная первичная половая клетка получает значительное число сигналов TGFβ (Akiyama et al., 2008; Wang et al., 2008; Guo, Wang, 2009; Hayashi et al., 2009)¹. Активация сигнального каскада BMP в ППК препятствует дифференцировке через репрессию транскрипции генов, отвечающих за дифференцировку, в первую очередь *bam*. Когда происходит экспрессия этого гена, клетка идет по пути дифференцировки в ооцит (рис. 5.8).

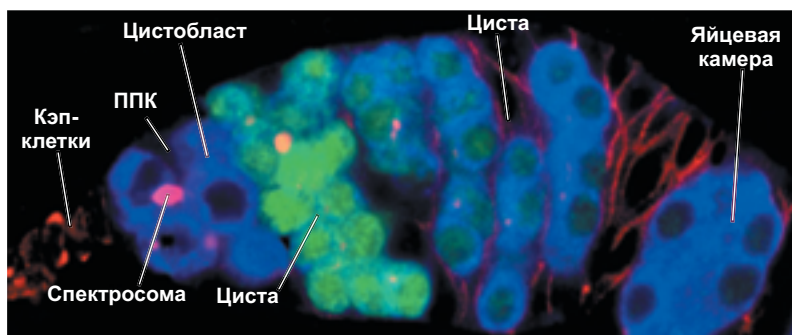
Как в семенниках, так и в яичниках *Drosophila* контроль клеточных делений тесно связан с адгезионным и паракринным механизмами репрессии дифференцировки и самообновления пула ППК и клеток-предшественников. На данный момент появляется все больше данных по поводу эпигенетической регуляции созревания ППК, например гистоновая метилтрансфераза Set1 служит важнейшим фактором самообновления ППК (Yan et al., 2014).

Постнатальная ниша стволовых клеток в вентрикулярно-субвентрикулярной зоне

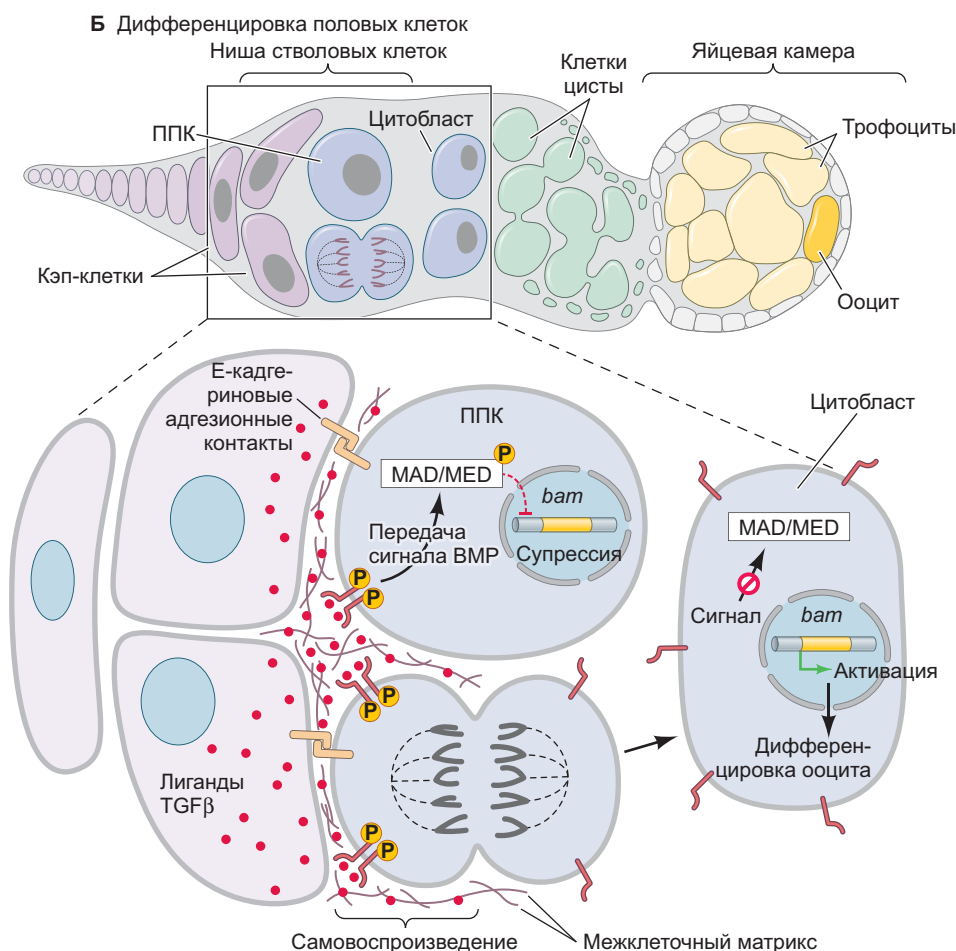
Несмотря на первые сообщения о существовании нейрогенеза у взрослых организмов, например

¹ Усиление или потеря функции белков TGFβ приводит к опухолевидному расширению популяции ППК или потере ППК соответственно (Xie and Spradling, 1998).

Рис. 5.10. Ниша стволовых клеток в яичнике *Drosophila*. **А.** Иммуноцитохимическое окрашивание разных типов клеток в гермариуме *Drosophila*. Первичные половые клетки (ППК) можно определить по присутствию спектросом. Дифференцирующиеся половые клетки (цистобласты) окрашены синим. Клетки, экспрессирующие ВАН (клетки цисты) окрашены зеленым. **Б.** Взаимодействие между кэп-клетками и ППК в гермариуме. (Из: M. Slaidina, R. Lehmann, 2014, *J Cell Biol* 207: 13–21)



Из: M. Slaidina and R. Lehmann, 2014, *J Cell Biol* 207: 13–21



у постнатальных крыс (в 1969 г.) и у певчих птиц (в 1983 г.), доктрина о том, что во взрослом мозге не появляются новые нейроны, существовала несколько десятилетий. В XXI в. множество исследований, в первую очередь на мозге млекопитающих, начали находить серьезные подтверждения продолжающегося в течение жизни нейрогенеза (Gage, 2002). Признание существования **нейральных стволовых клеток** (НСК) в центральной нервной системе взрослого человека (ЦНС) знаменует собой начало важного периода в развитии науки и имеет огромное значение как для понимания развития мозга, так и для лечения неврологических расстройств.

Как у рыб, так и у человека взрослые НСК сохраняют большую часть клеточной морфологии и мо-

лекулярных характеристик своей эмбриональной клетки-предшественника — радиальной глияльной клетки¹. Радиальные клетки глии и взрослые НСК представляют собой поляризованные эпителиальные клетки, занимающие всю апикально-базальную ось ЦНС (Grandel, Brand, 2013). Развитие радиальной глии и происхождение ниши НСК взрослого млеко-

¹ Большинство НСК проявляют свойства глияльных клеток, хотя есть исключения. Самообновляющиеся нейроэпителиоподобные клетки сохраняются в тельцефалоне зебры и функционируют как нейронные предшественники, которым недостает типичной глияльной экспрессии генов. Дополнительную информацию см. в работах лаборатории Michael Brand (Kaslin et al., 2009; Ganz et al., 2010; Ganz et al., 2012).

питающего рассмотрены в гл. 14. У таких анамний, как костистые рыбы, радиальная глия функционирует в качестве НСК в течение всей жизни; данные клетки расположены в нейрогенных зонах (их не менее 12) во взрослом мозге (Than-Trong, Bally-Cuif, 2015).

Однако в мозге у взрослых млекопитающих НСК находятся только в двух основных областях головного мозга: **субгранулярной зоне (СГЗ)** гиппокампа и **вентрикулярно-субвентрикулярной зоне (В-СВЗ)** боковых желудочков (Faigle, Song 2013; Urbán, Guil-

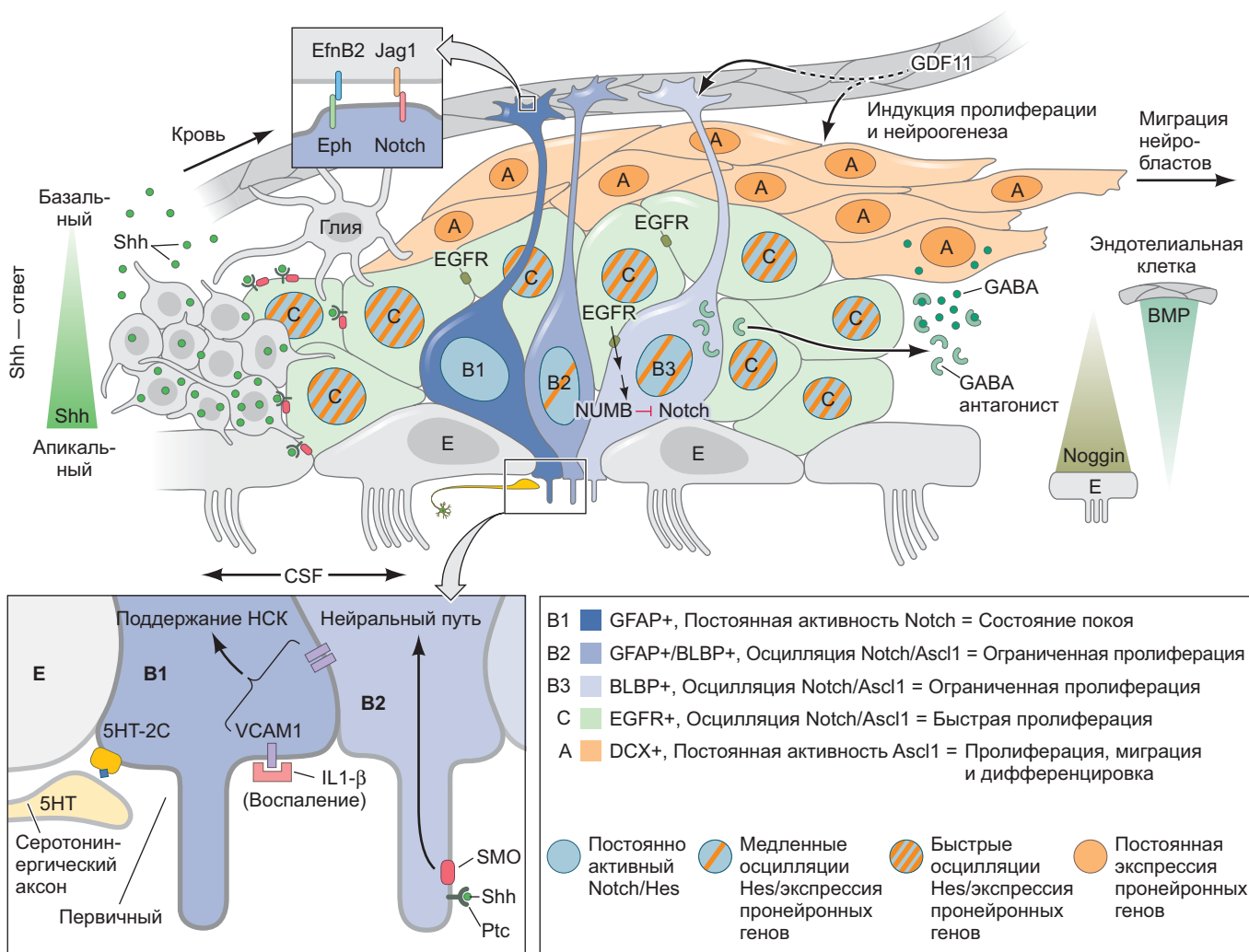


Рис. 5.11. Схема вентрикулярно-субвентрикулярной ниши стволовых клеток и ее регуляции. Мультицилиарные эпендимные клетки Е (светло-серые) располагаются вдоль желудочка и контактируют с апикальной поверхностью НСК в В-СВЗ (синие). Обычно покоящиеся НСК типа В1 (темно-синий) дают начало активным клеткам В2 и В3 (светлые оттенки синего), обладающим способностью к ограниченной пролиферации. Клетки В3 генерируют клетки С (зеленые), которые после трех циклов деления дают начало мигрирующим нейробластам (клетки А; оранжевые). Ниша пронизана кровеносными сосудами, частично контактирующими с отростками В-клеток. Поддержание пула стволовых клеток регулируется адгезией VCAM1 и Notch-сигналингом (осцилляции Notch изображают как изменения цвета ядер). Скопления нейронов в вентральной области бокового желудочка экспрессируют Sonic hedgehog (Shh), который влияет на дифференцировку нейральных клеток из ниши. Антагонистическая сигнализация между BMP и Noggin от эндотелиальных клеток и эпендимных клеток, соответственно, уравнивает нейрогенез вдоль этого градиента. Серотонинергические (5HT) аксоны пронизывают желудочковую поверхность и, наряду с IL1-β и GDF11 из цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и крови соответственно, играют роль внешних стимулов для регуляции ниши. Нейроны, астроциты и клетки глии, находящиеся внутри ниши, влияют на ее регуляцию. GFAP — глиальный кислый фибриллярный белок; BLBP — липидсвязывающий белок мозга; DCX. (По данным: О. Basak et al., 2012. *J Neurosci* 32: 5654–5666; C. Giachino et al., 2014. *Stem Cells* 32: 70–84; D. A. Lim and A. Alvarez-Buylla, 2014. *Trends Neurosci* 37: 563–571; C. Ottone et al., 2014. *Nat Cell Biol* 16: 1045–1056.)

lemot, 2014). Существуют сходства и различия между нейрогенными нишами млекопитающих, следовательно, каждый тип НСК обладает свойствами, соответствующими их глиальному происхождению, но только НСК В-СВЗ поддерживает контакт с цереброспинальной жидкостью. Во время развития взрослого В-СВЗ глиоподобные НСК переходят в **клетки типа В**, которые поддерживают формирование специфических типов нейронов и в обонятельной луковице, и в полосатом теле, как это было показано в мозге мыши и человека (рис. 5.11; Curtis et al., 2012; Lim, Alvarez-Buylla, 2014).

Нейронная ниша стволовых клеток в В-СВЗ

В В-СВЗ В-клетки формируют на апикальной поверхности первичную ресничку (см. гл. 4), проникающую в спинномозговую жидкость желудочковой полости, а длинный базальный отросток завершается синапсом, плотно контактирующим с кровеносными сосудами (сродни отросткам астроцитов, которые способствуют образованию гематоэнцефалического барьера). Основные клеточные компоненты ниши В-СВЗ включают четыре типа клеток: 1) слой эпендимных клеток, расположенных вдоль стенки желудочка (Е-клеток); 2) нейральную стволовую клетку, называемую В-клеткой; 3) клетки-предшественники (транзиторно-амплифицирующие, С-клетки); 4) мигрирующие нейробластные клетки А (рис. 5.11). Небольшие скопления В-клеток окружены мультицелиарными Е-клетками, образующими структуру розетки (рис. 5.12А; Mirzadeh et al., 2008). Формирование клеток в пределах В-СВЗ начинается в его центральном ядре с делящейся В-клетки, которая непосредственно порождает С-клетку. Клетки-предшественники типа С пролиферируют и развиваются в предшественники нейронов типа А, поступающие в обонятельную луковицу для окончательной дифференцировки в нейроны (рис. 5.11). В-клетки были дополнительно разделены на три подтипа (В1, В2 и В3) на основании различий в пролиферативном статусе, которые коррелируют с различными паттернами экспрессии глиальных генов (Codega et al., 2014; Giachino et al., 2014). Важно отметить, что в нише НСК клетки типа В1 находятся в состоянии покоя, тогда как клетки типа В2 и В3 представляют собой активно пролиферирующие нейральные стволовые клетки (Basak et al., 2012)¹.

ПОДДЕРЖАНИЕ ПУЛА НСК ПОСРЕДСТВОМ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Поддержание пула стволовых клеток — важнейшая функция любой ниши стволовых клеток, поскольку излишнее число симметричных делений клеток-предшественников с последующей дифференцировкой могут истощить пул стволовых клеток. Ниша В-СВЗ имеет особую структуру и обладает сигнальными системами для обеспечения того, чтобы ее В-клетки не исчезали во время сигналов к нейрогенному росту или восстановлению в ответ на повреждение.

VCAM1 и контакты с розетковидной нишей.

Структура розетки служит отличительным признаком ниши В-СВЗ. Она поддерживается, по крайней мере частично, специфичной клеточной адгезионной молекулой VCAM1 (Kokovay et al., 2012). По мере старения мозга млекопитающих уменьшается как количество наблюдаемых розетковидных структур (рис. 5.12А), так и количество нейральных стволовых клеток в этих розетках, что коррелирует со снижением нейрогенеза в более позднем возрасте (Mirzadeh et al., 2008; Mirzadeh et al., 2010; Sanai et al., 2011; Shake et al., 2012; Shake et al., 2014). Подобно тому, как туристы в лагере сидят вокруг костра, эпендимные клетки окружают каждую клетку типа В; и подобно тому, как огонь может погаснуть или вспыхнуть, в соответствии с усилиями туристов, В-клетка реагирует на сигналы от эпендимных клеток (и на другие сигналы ниши), оставаясь в состоянии покоя либо активируясь. В-клетки, наиболее тесно связанные с эпендимными клетками, находятся в состоянии покоя. Более свободно расположенные В-клетки (В2- и В3-клетки) активно пролиферируют (Doetsch et al., 1997). Экспериментальное ингибирование адгезионного белка VCAM1, специфично локализованного в апикальном отростке В-клеток (рис. 5.12А), нарушает структуру розетки и вызывает активацию и дифференцировку НСК (рис. 5.12Б; Kokovay et al., 2012). Таким образом, чем сильнее адгезия, тем стабильнее состояние покоя.

Notch, часы дифференцировки. Было обнаружено, что сигнализация Notch играет важную роль в поддержании пула стволовых клеток типа В (Pierfelice et al., 2011; Giachino and Taylor, 2014). Белки

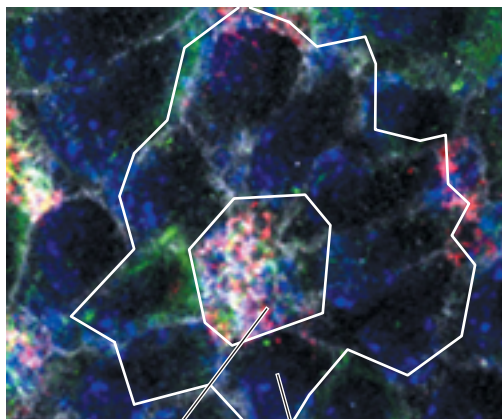


Загадки развития

Различные уровни активности Notch означают своевременный переход от покоя к нейрогенезу; впрочем, мы знаем достаточно о колебаниях активности генов *Notch/Delta* и *Hes* во время эмбрионального развития. Как на самом деле выглядят колебания активности этих генов в нише нервных стволовых клеток у взрослого организма? Каким образом колебания вызывают переход от стволовой клетки к нейрону?

¹ В мышинной В-СВЗ одна В-клетка может дать 16–32 А-клеток: каждая С-клетка, которую производит В-клетка, будет делиться три раза, а их потомство А-клеток обычно делится один раз, давая 16 клеток, но может делиться и дважды, давая 32 клетки (Ponti et al., 2013).

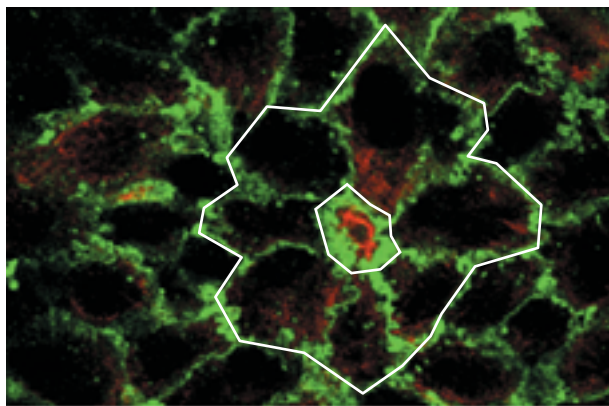
А



В-клетки Клетки эпендимы

Б

Контроль



VCAM1 заблокирован

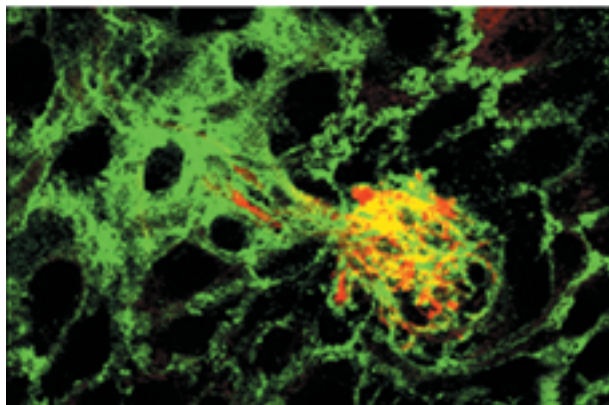
Из: E. Kokovay et al. 2012.
Cell Stem Cell 11: 220–230

Рис. 5.12. VCAM1 и архитектура розетки. **А.** При помощи мембранных маркеров можно выявить розетковидное расположение клеток НСК в нише В-СВЗ. Иммуноцитохимическое окрашивание на VCAM1 (красный) показывает его колокализацию с GFAP (зеленый) в В-клетках в ядре розетки. Синее пятно указывает на присутствие β-катенина; структура розетки очерчена белым цветом. **Б.** Блокирование адгезии с помощью антител к VCAM1 нарушает структуру розетки, состоящую из В-клеток и эпендимных клеток. На этих фотографиях красным цветом обозначен GFAP; зеленый указывает на присутствие β-катенина. (По данным: E. Kokovay et al., 2012. *Cell Stem Cell* 11: 220–230.)

семейства Notch функционируют как трансмембранные рецепторы, и через межклеточные взаимодействия внутриклеточный домен Notch (NICD) расщепляется и высвобождается для функционирования как часть фактора транскрипции, входящего в состав комплекса, который подавляет экспрессию пронейральных генов (см. рис. 5.11). Более высокие уровни активности NICD поддерживают устойчивость стволовых клеток, в то время как снижение уровня активности сигнального пути Notch способствует пролиферации и созреванию предшественников в нейронном направлении¹.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В ВЕНТРИКУЛЯРНО-СУБВЕНТРИКУЛЯРНОЙ НИШЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Основная функция ниши стволовых клеток состоит в том, чтобы производить новые клетки-предшественники, способные дифференцироваться в определенные типы клеток. В нише В-СВЗ задействован ряд факторов, таких как EGF- и BMP-сигналинг.

EGF подавляет Notch-сигналинг. Как уже говорилось, активация Notch способствует поддержанию состояния покоя и подавляет дифференцировку, поэтому одним из механизмов стимуляции нейрогенеза является ослабление (и колебание) активности Notch. Клетки-предшественники типа С осуществляют эту функцию через рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), который регулирует NUMB, что в свою очередь ингибирует NICD (см. рис. 5.11; Aguirre et al., 2010). Таким образом, сигналинг через EGFR способствует дифференцировке стволовых клеток, уравнивая сигнализацию Notch (McGill and McGlade, 2003; Kuo et al., 2006; Aguirre et al. 2010).

BMP-сигналинг и ниша НСК. Дальнейшее движение по пути дифференцировки происходит за счет дополнительных факторов, таких как BMP, который способствует глиогенезу в В-СВЗ так же, как и в других участках мозга млекопитающих (Lim et al., 2000; Colak et al., 2008; Gajera et al., 2010; Morell et al., 2015). BMP-сигнал из эндотелиальных клеток поддерживается на высоком уровне в базальной части ниши, в то время как эпендимные клетки на апикальной стороне секретируют Noggin, ингибитор BMP, поддерживая сигнал на низком уровне в данной области. Следовательно, когда ВЗ-клетки переходят в прогениторные клетки типа С и двигаются близко

¹ Многие из ролей, которые играет сигнализация Notch в нейрогенезе взрослого мозга, сходны с его регуляцией радиальной глии в эмбриональном мозге, но некоторые важные различия все же присутствуют. Прямое сравнение Notch-сигналов в эмбриональном и взрослом нейрогенезе у разных видов животных см. в работах Pierfelice с соавторами (2011) и Grandel и Brand (2013).

к базальному краю ниши, они повышают уровень BMP-сигнала, который способствует нейрогенезу преимущественно в направлении глиальной дифференцировки (см. рис. 5.11).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ВЛИЯНИЕ ОКРУЖЕНИЯ НА НИШУ НСК

Ниша НСК во взрослом организме должна реагировать на изменения в организме. Такими изменениями могут быть травмы и воспаления, физические нагрузки и смена циркадных ритмов. Как ниша НСК отреагирует на них? Спинномозговая жидкость, нейронные сети и сосудистая сеть находятся в непосредственном контакте с нишей и могут влиять на состояние НСК с помощью паракринных механизмов, электрофизической активности мозга и эндокринной сигнализации, передаваемой через кровеносную систему.

Нейронная активность. Присущие этой нише мигрирующие нейральные предшественники выделяют нейромедиатор ГАМК (гамма-аминомасляную кислоту), который отрицательно воздействует на клетки-предшественники и снижает скорость их пролиферации. Это действие уравнивает секреция В-клетками ингибитора ГАМК (диазепамсвязывающего ингибирующего белка), ускоряющего пролиферацию в нише (Alfonso et al., 2012). У различных типов нейронов были также обнаружены синаптические связи (см. ссылки, приведенные в работе Lim и Alvarez-Buylla, 2014), такие же как связи между серотонинергическими нейронами и эпендимными клетками и клетками типа В (Tong et al., 2014). Клетки типа В экспрессируют серотониновые рецепторы, и активация серотонинового пути в клетках В1 увеличивает пролиферацию в В-СВЗ, в то время как супрессия этого пути уменьшает пролиферацию (см. рис. 5.11).

Сигналинг Sonic hedgehog и ниша НСК. Так же как разделение нервной трубки в эмбрионе на паттерны (см. гл. 13), формирование различных типов нейрональных клеток в области В-СВЗ частично обусловлено градиентом Shh, экспрессирующимся от апикальной (высокая концентрация Shh) к базальной (низкая концентрация Shh) оси ниши (Goodrich et al., 1997; Bai et al., 2002; Ihrie et al., 2011)¹. Нокаут гена Shh приводит к сокращению обонятельных нейронов, имеющих апикальное происхождение (Ihrie et al., 2011). Данный результат говорит о том, что клетки, берущие начало от кластеров НСК, находящихся в апикальном положении, будут иметь иной нейрональный

путь развития по сравнению с клетками, происходящими от НСК, находящихся в базальном положении из-за разницы в интенсивности сигнала Shh (см. рис. 5.11).

Взаимодействие с кровеносной системой. Сосудистая сеть интенсивно проникает в нишу В-СВЗ: от клеток кровеносных сосудов (эндотелиальных, гладкомышечных, перicyтов) до ассоциированного внеклеточного матрикса и компонентов крови (Licht and Keshet, 2015; Ottone and Parrinello, 2015). Несмотря на апикальное расположение тел В-клеток, которые могут быть расположены довольно далеко от кровеносных сосудов, их базальные отростки тесно связаны с сосудистой сетью (см. рис. 5.11). Как обсуждалось выше, Notch-сигналинг является ключевым для контроля состояния клеток В1. Рецепторы Notch на отростках В-клетки связываются с трансмембранным рецептором Jagged1 (Jag1) эндотелиальных клеток, что приводит к формированию транскрипционного фактора NICD, и в результате чего сохраняется состояние покоя клеток В1 (Ottone et al., 2014). По мере того как клетки В2 и В3 переходят в клетки-предшественники типа С, их базальные связи с эндотелиальными клетками теряются, следовательно, количество NICD уменьшается, что позволяет клеткам-предшественникам созревать.

Для того чтобы вещество, транспорт которого происходит с помощью крови, могло влиять на нейрогенез, ему необходима способность к преодолению гематоэнцефалического барьера, однако ниша НСК более доступна, чем другие области мозга (см. рис. 5.11; Tavazoie et al., 2008). Одна из самых интересных молекул, достигающих ниши НСК, — это дифференцировочный фактор роста 11 (GDF11, известный также как BMP11), который, по-видимому, предотвращает некоторые симптомы старения мозга. Как и у людей, у мышей в старости значительно снижается нейрогенный потенциал. Исследования показали, что некоторые вещества в кровеносной системе молодых мышей могут предотвратить снижение нейрогенеза в ходе эксперимента по хирургическому соединению кровеносных систем молодой и старой мышей (гетерохронный парабиоз). За возникшим при этом повышением васкуляризации в мозге старой мыши (рис. 5.13А) последовала повышенная пролиферация НСК, восстановившая нейрогенез и когнитивные функции (Katsimpardi et al., 2014). В другом исследовании было показано, что можно восстановить нейрогенный потенциал в В-СВЗ мозга старой мыши при использовании единственного фактора GDF11. Важно отметить, что данный результат довольно противоречив, и на сегодняшний день точно неизвестно, снижается ли уровень GDF11 с возрастом и может ли он аналогичным образом усиливать регенерацию мышц (рис. 5.13Б; Лоффредо et al., 2013;

¹ Градиент Shh в мозге описан как ориентированный вдоль дорсально-вентральной оси; для упрощения, однако, мы ограничили наше обсуждение его присутствием только вдоль апикбазальной оси.

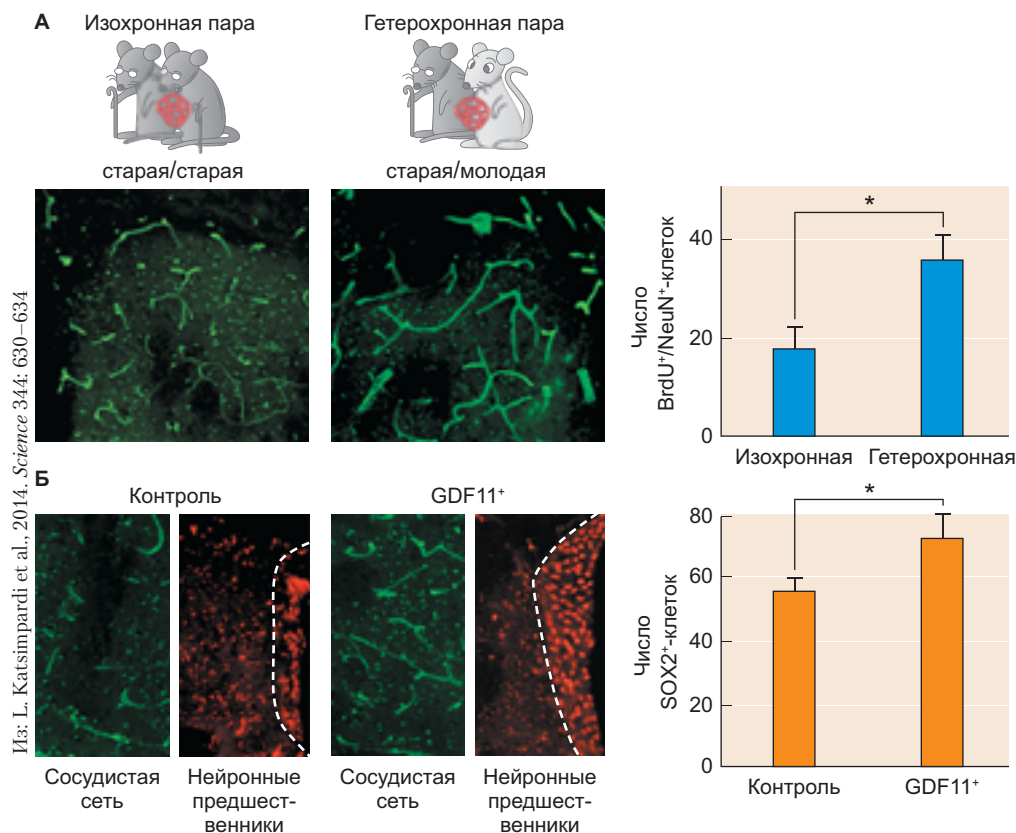


Рис. 5.13. Кровь молодой мыши способна «омолодить» старую мышь. **А.** Парабиоз, слияние кровеносных систем двух особей, был осуществлен с использованием мышей одного (изохронного) или разных (гетерохронных) возрастов. Когда кровеносные системы молодой и старой мышей соединили, было показано увеличение сосудистой сети (обозначена *зеленым цветом*), а также увеличение количества пролиферирующих нейральных предшественников у старой мыши. **Б.** Введение GDF11 в кровеносную систему старой мыши было достаточным для аналогичного увеличения как сосудистой сети (*зеленый цвет*), так и популяции нейральных клеток-предшественников в В-СВЗ (*красный цвет*, количество SOX2⁺-клеток показано на графиках). (По данным: L. Katsimpardi et al., 2014. *Science* 344: 630–634.)

Poggioli et al., 2015)¹. Недавно было показано, что доставка GDF11 непосредственно в мозг мыши после перенесенного инсульта приводила к значительной регенерации нейронов (Lu et al., 2018). Кроме того, системное лечение пожилой мыши с помощью GDF11, который остается только в сосудистой системе, индуцировало нейрогенез в гиппокампе (Ozek et al., 2018). Вместе эти результаты позволяют предположить, что связь между нишей НСК и окружающей их сосудистой системой — это основной регуляторный механизм нейрогенеза в мозге взрослого человека и, по-видимому, с ним связаны изменения, лежащие в основе некоторых когнитивных дефицитов, вызванных старением.

¹ Недавно обнаружили, что уровень GDF11 не снижается с возрастом (Egerman et al., 2015). Кроме того, несмотря на утверждения, что GDF11 необходим для регенерации мышц (Sinha et al., 2014), это исследование показало, что GDF11 (как и миостатин) ингибирует рост мышц. Связанное с возрастом снижение уровня GDF11 было подтверждено рядом авторов (Poggioli et al., 2015), однако влияние GDF11 на нейрогенез не оспаривалось и в работе Эгермана с коллегами.

Постнатальная ниша стволовых клеток кишечника

Нейральная стволовая клетка является частью специализированного эпителия, но не все эпителиальные ниши одинаковы. Эпителиальная выстилка кишечника млекопитающих формирует миллионы пальцевидных ворсинок, направленных в просвет кишечника для поглощения питательных веществ. Основание каждой ворсинки погружено в углубление, называемое **криптой**, которое соединяется с соседними ворсинками (**рис. 5.14А**). Для понимания функционирования ниши стволовых клеток кишечника (СКК) важна оценка быстрого темпа смены клеток в кишечнике.

Самообновление клеток в крипте

Клетки формируются в криптах, тогда как их удаление в основном происходит на концах ворсинок. Благодаря восходящему движению из крипты к вер-

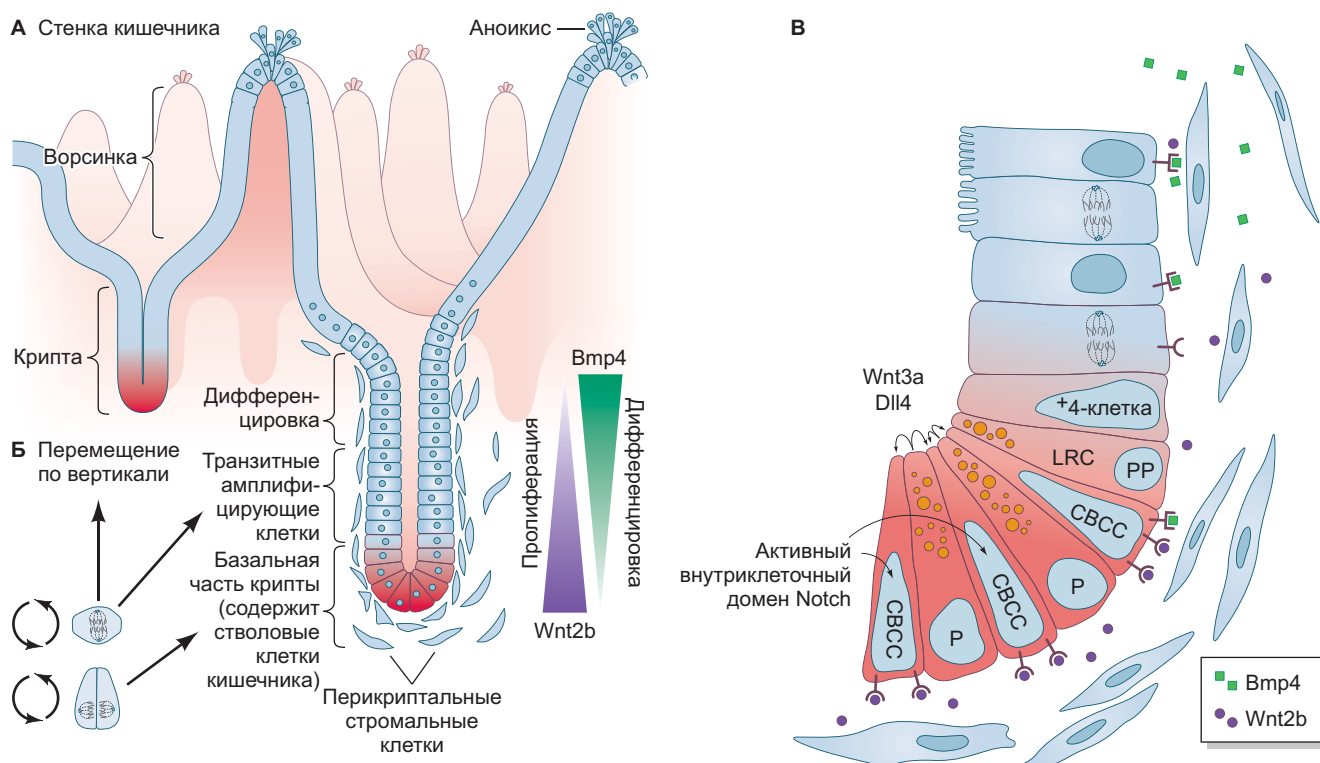


Рис. 5.14. Ниша стволовых клеток кишечника и ее регуляторы. **А.** Кишечный эпителий состоит из длинных пальцевидных ворсинок, выступающих в просвет, а у основания ворсинок эпителий расширяется в углубления, называемые криптами. Стволовые клетки кишечника и их предшественники находятся на самом дне крипт (красный цвет), а гибель клеток через апоптоз происходит на вершине ворсинок. **Б.** Вдоль проксимодистальной оси (от крипты к ворсинке) эпителий крипты может быть функционально разделен на три области: основание крипты содержит стволовые клетки, пролиферативная зона состоит из транзитных амплифицирующих клеток, а зону дифференцировки характеризует созревание эпителиальных клеток. Перикрипальные стромальные клетки окружают базальную поверхность крипты и выделяют противоположные морфогенные градиенты Wnt2b и Bmp4, которые регулируют поддержание стволовых клеток и дифференцировку соответственно. **В.** Наиболее активное увеличение числа клеток характерно для основания крипты. Клетки Панета (P) секретируют Wnt3a и Dll4, которые стимулируют пролиферацию столбчатых клеток Lgr5⁺ в базальной части крипты (CBCC) частично за счет активации внутриклеточного домена Notch (NICD). +4-Клетки — это четыре клетки относительно клеток Панета и потенциально неподвижные стволовые клетки крипты. LRC — клетки, сохраняющие метку; PP — предшественники клеток Панета

шине ворсинки, оборот клеток кишечного эпителия происходит приблизительно каждые 2–3 дня (Darwich et al., 2014)¹. Несколько стволовых клеток находится в основании каждой крипты в тонком кишечнике мыши, некоторые дочерние клетки остаются в криптах в качестве стволовых клеток, тогда как другие становятся прогениторными клетками и быстро делятся (рис. 5.14Б, Lander et al., 2012; Barker, 2014; Krausova, Korinek, 2014; Koo, Clevers, 2014). Деление стволовых клеток внутри крипты и клеток-предшественников приводит к перемещению клеток вертикально вверх по крипте к ворсинкам, и по мере того как клетки продвигаются дальше от основания крипты, они постепенно дифференцируются в клетки, характерные для эпителия тонкого кишечника: энтероциты, бокаловидные клетки и энтероэндокринные клетки. Достигнув кончика кишечной ворсинки,

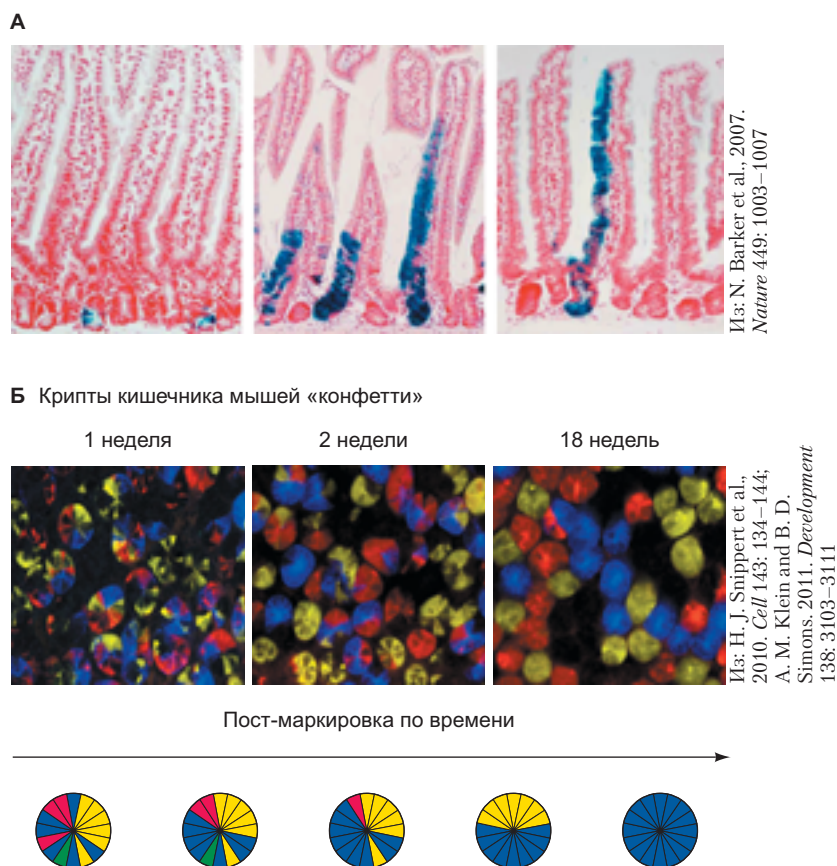
они сбрасываются и подвергаются **аноикису** — процессу запрограммированной клеточной гибели (апоптозу), вызванному потерей прикрепления, в данном случае потерей контакта с другими эпителиальными клетками ворсинки и внеклеточным матриксом (рис. 5.14А)².

Исследования по отслеживанию происхождения клеток (Barker et al., 2007; Снипперт и др. 2010; Sato et al., 2011) показали, что стволовые клетки кишечника (экспрессирующие белок Lgr5) могут

¹ Этот показатель был определен с помощью мета-анализа у шести видов животных, включая мышей и людей.

² Этот процесс очень напоминает рост гидры, где каждая клетка формируется у основания животного, мигрирует, чтобы стать частью дифференцированного тела, и в конце концов сбрасывается с кончиков щупалец (см. гл. 22).

Рис. 5.15. Клоногенная природа ниши стволовых клеток кишечника. **А.** У трансгенных мышей, чувствительных к Сте-рекомбиназе, с использованием промотора *Lgr5* и репортера *Rosa26-LacZ* маркированы дискретные клоны стволовых клеток кишечника в основании крипты (*синий цвет*). Сохранение *LacZ* у потомков клеток с течением времени показывает прогрессивное движение вверх по ворсинке. **Б.** Мозаичная маркировка стволовых клеток в кишечной крипте трансгенных мышей «конфетти» демонстрирует стохастическую прогрессию в сторону моноклональных (визуализируемых в виде одного цвета) крипт с течением времени. Эта же прогрессия может быть математически смоделирована для получения цветовых паттернов, как показано ниже



производить все типы клеток эпителия кишечника. Из-за их специфичного расположения в самом основании крипты *Lgr5*⁺-стволовые клетки называют столбчатыми клетками основания крипты (СКОК), и расположены они вместе с дифференцированными клетками Панета, местонахождение которых также ограничено основанием крипты (рис. 5.14В; Sato et al., 2011). Одним из наиболее убедительных доказательств того, что СКОК представляют собой «активные стволовые клетки», служит тот факт, что одна из таких клеток может полностью заселить крипту с течением времени (рис. 5.15; Snippert et al., 2010). После симметричного деления СКОК одна из дочерних клеток будет соседствовать с клеткой Панета, в то время как другая будет оттеснена от основания, чтобы пройти процесс дифференцировки в эпителиальную клетку кишечника. Таким образом, конкуренция за связь с клетками Панета определяет, какая из них останется стволовой, а какая в дальнейшем дифференцируется (Klein, Simons, 2011).

Стволовые клетки обеспечивают поддержание клеточного состава крови

Каждый день в вашей крови более 100 млрд клеток заменяются новыми клетками. Независимо от функции, выполняемой данным типом клеток, будь то га-

зообмен или иммунитет, **гемопоэтическая стволовая клетка** (ГСК) находится на верхней ступени клеточной иерархии. Эти клетки поддерживают удивительную «машину по производству клеток», которая является нишей ГСК (см. рис. 18.24). Значение ГСК для организма невозможно переоценить. С конца 1950 годов терапию стволовыми клетками с помощью ГСК стали использовать для лечения заболеваний крови при трансплантации костного мозга¹. Кроме того, «гипотеза ниши» стволовой клетки, находящейся в специализированном микроокружении и контролируемой им, была впервые выдвинута для ГСК (Schofield, 1978).

Гемопоэтическая ниша стволовых клеток

В сильно васкуляризованной ткани костного мозга расположена ниша стволовых клеток (рис. 5.16). ГСК находятся в непосредственной близости от костных клеток (остеоцитов), эндотелиальных клеток, выстилающих кровеносные сосуды, и стромальных клеток. Гемопоэтическую нишу можно

¹ Первая успешная трансплантация костного мозга была проведена между двумя однояйцевыми близнецами, у одного из которых была лейкемия. Ее проводил доктор Э. Донналл Томас, чьи дальнейшие исследования в области трансплантации стволовых клеток принесли ему Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 1990 г.

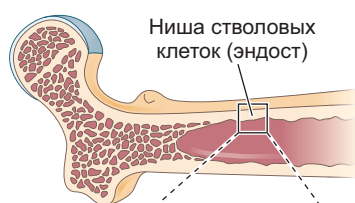
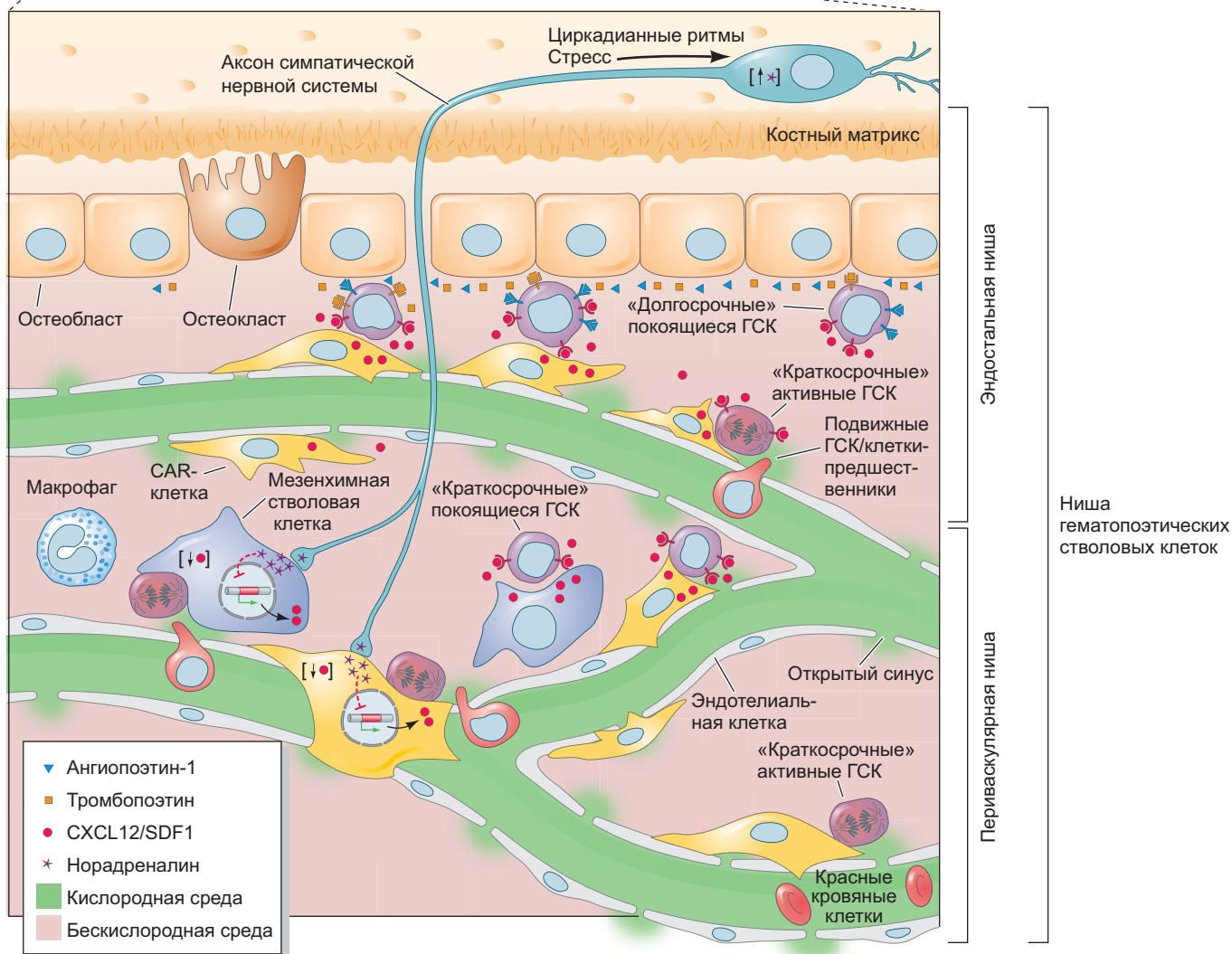


Рис. 5.16. Модель ниши ГСК. Расположенную в костном мозге нишу ГСК можно разделить на две подниши: эндостальную и периваскулярную. ГСК в эндостальной нише, связанные с остеобlastами с помощью адгезивных белков, являются «долгосрочными» ГСК (показаны фиолетовым), они обычно покоятся, тогда как «краткосрочные» активные ГСК (красные) связаны с кровеносными сосудами (зеленые) в богатых кислородом участках. Стромальные клетки, т. е. CAR-клетки (желтые), и мезенхимные стволовые клетки непосредственно взаимодействуют с подвижными ГСК и клетками-предшественниками, которые могут быть простимулированы симпатической нервной системой.



разделить на две области: эндостальную (внутрикостную) и периваскулярную (рис. 5.16)¹. В эндостальной нише ГСК часто находятся в непосредственном контакте с остеобlastами, выстилающими внутреннюю поверхность кости, а в периваскулярной нише — в тесном контакте с клетками, высти-

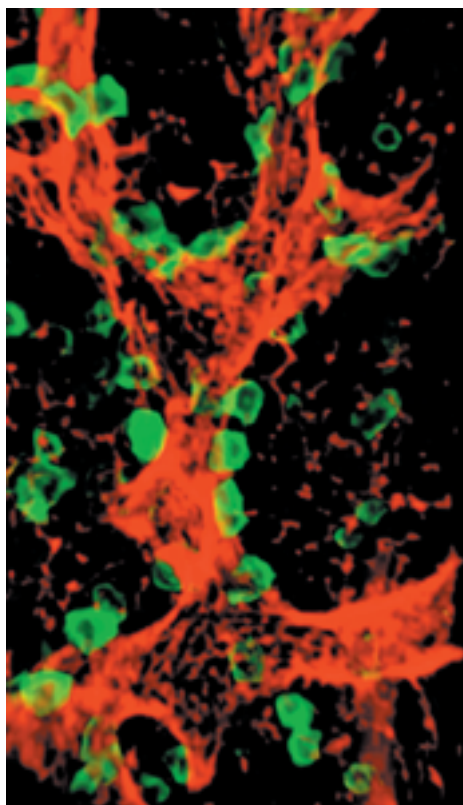
лающими или окружающими кровеносные сосуды (эндотелиальные и стромальные). Различные физические и клеточные свойства обеспечивают регуляцию дифференцировки ГСК (Wilson et al., 2007). Кроме того, в нишах есть две субпопуляции ГСК: одна популяция может быстро делиться в случае необходимости, в то время как покоящаяся популяция является резервной и обладает большим потенциалом для самообновления (Wilson et al., 2008, 2009). В зависимости от физиологических условий стволовые клетки из одной субпопуляции могут переходить в другую.

¹ Peri на латинском означает «вокруг». Периваскулярные клетки относятся к клеткам, расположенным на периферии кровеносных сосудов. Периваскулярную нишу называют также сосудистой нишей, а эндостальную нишу — остеобlastной.

Загадки развития

Почему долгое время жизни ИСК может быть оставлено на волю случая и как это может помочь в предотвращении возникновения рака?

ГСК, обнаруженные в эндостальной нише, как правило, относятся к покоящейся популяции, причем самообновление таких клеток происходит в течение долгого срока и служит для поддержания популяции стволовых клеток в течение всей жизни организма (Wilson et al., 2007). Напротив, более активные ГСК, как правило, находятся в периваскулярной нише. Для них характерны более быстрые циклы обновления и развитие предшественников в течение более короткого периода времени (рис. 5.16). Сложный коктейль из молекул клеточной адгезии, паракринных факторов, компонентов внеклеточного матрикса, гормональных сигналов, изменений давления со стороны кровеносных сосудов и воздействия симпатических нервных окончаний в совокупности влияет на регуляцию пролиферации ГСК (Spiegel et al., 2008; Malhotra, Kincade 2009; Cullen et al., 2014).



Из: C. Nombela-Arrieta et al., 2013. *Nat Cell Biol* 15: 533–543

Рис. 5.17. ГСК располагаются рядом с микроциркуляторным руслом в костном мозге. Рецептор c-Kit (показан зеленым) является маркером ГСК и предшественников, которые видны в непосредственном контакте с синусоидальной микроциркуляторной системой в нише (окрашены антиамином; красный). ГСК связаны со всеми типами сосудистой сети в этой нише

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Регуляторные механизмы в эндостальной нише

В эндостальной нише ГСК тесно взаимодействуют с остеобластами, и изменение количества остеобластов вызывает аналогичное изменение количества ГСК (Zhang et al., 2003; Visnjic et al., 2004; Lo Celso et al., 2009; Al-Drees et al., 2015; Boulais, Frenette, 2015). Кроме того, остеобласты способствуют переходу ГСК в покоящееся состояние путем связывания ГСК и секреции ангиопоэтина-1 и тромбопоэтина, которые удерживают эти стволовые клетки в резерве для долгосрочного гемопоэза (Arai et al., 2004; Qian et al., 2007; Yoshihara et al., 2007). Эндостальная ниша пронизана синусоидными капиллярами (Nombela-Arrieta et al., 2013)¹, и часть из ГСК (c-Kit+) и клеток-предшественников тесно связаны с этим высокопроницаемым микроциркуляторным руслом (рис. 5.17). Ранее предполагалось, что эндостальная ниша находится в условиях гипоксии, в отличие от периваскулярной ниши, но синусоидные капилляры, несомненно, служат для снабжения кислородом эндостальных областей, делая микроокружение, непосредственно окружающее капилляры, менее гипоксичным. Поэтому считается, что ГСК могут воспринимать различия в содержании кислорода в нише в качестве сигнала, дающего информацию о местоположении кровеносных сосудов (Nombela-Arrieta et al., 2013).

Регуляторные механизмы в периваскулярной нише СК

Специфичная для клеток регуляция концентрации цитокина CXCL12, по-видимому, является важным механизмом, регулирующим состояние покоя и удержание ГСК и клеток-предшественников в периваскулярной нише. CXCL12 выделяет несколько типов клеток, таких как эндотелиальные CAR-клетки и **мезенхимные стволовые клетки** (МСК) (рис. 5.16; Sugiyama et al., 2006; Méndez-Ferrer et al., 2010). Потеря CXCL12 в клетках CAR вызывает массовое перемещение гемопоэтических клеток-предшественников в кровоток, в то время как селективный нокаут CXCL12 в МСК способствует снижению числа ГСК (Greenbaum et al., 2013).

Интересно, что существуют дневные колебания скорости перемещения клеток-предшествен-

¹ Синусоидные капилляры представляют собой небольшие капилляры с большим числом пор, что обеспечивает высокую степень проницаемости между капилляром и тканью, в которой он находится.

ников в кровоток: большее деление клеток ГСК происходит ночью, а повышенная миграция клеток-предшественников в кровоток — в течение дня. Этот циркадианный ритм мобилизации контролирует высвобождение норадреналина из симпатических аксонов, проникающих в костный мозг (рис. 5.16, Méndez-Ferrer et al., 2008; Kollet et al., 2012). Рецепторы стромальных клеток реагируют на данный нейромедиатор снижением экспрессии CXCL12, что временно уменьшает влияние стромальных клеток на ГСК и клетки-предшественники, стимулируя их к переходу в кровеносное русло. Хотя циркадианные ритмы обеспечивают нормальный цикл пролиферации ГСК, хронический стресс приводит к повышенному высвобождению норадреналина (Heidt et al., 2014). Это снижает уровень CXCL12, что уменьшает пролиферацию ГСК и увеличивает их мобилизацию в кровоток. Итак, в следующий раз, проснувшись, знайте, что ваша симпатическая нервная система приказывает вашим кроветворным стволовым клеткам тоже проснуться.

Дополнительные сигнальные факторы (Wnt, TGF- β , Notch/Jagged1, фактор стволовых клеток и интегрины; см. Al-Drees et al., 2015 и Boulais, Frenette, 2015) влияют на скорость формирования различных типов клеток крови в определенных условиях; примерами служат повышение концентрации лейкоцитов во время инфицирования организма и увеличение количества эритроцитов при подъеме на большую высоту. Когда эта система неправильно функционирует, могут возникать заболевания, такие как рак крови. Миелопролиферативные нарушения являются следствием ошибки в получении надлежащих сигналов для дифференцировки клеток крови (Walkley et al., 2007A, Б). Это происходит из-за неспособности остеобластов функционировать должным образом, в результате чего ГСК быстро пролиферируют без дифференцировки (Raaij-makers et al., 2010; Raaijmakers, 2012).

Мезенхимные стволовые клетки: поддержание разнообразия тканей взрослого организма

Большинство стволовых клеток взрослого организма способны формировать только нескольких типов клеток (Wagers et al., 2002). Например, когда ГСК, маркированные зеленым флуоресцентным белком, были трансплантированы мыши, их меченых потомков обнаружили только в крови животного, но не в какой-либо другой ткани (Alvarez-Dolado

Загадки развития

Мы обсудили два отдельных региона в нише ГСК, но, может быть, их больше? Было предположено, что МСК в костном мозге уникальным образом контролируют ГСК и представляют собой собственную нишу внутри ниши. Что вы думаете? Каково межклеточное взаимодействие и каким образом управляется движение ГСК между эндостальной, периваскулярной нишами и, потенциально, нишей МСК?

et al., 2003)¹. Однако некоторые стволовые клетки, по-видимому, обладают удивительно высокой степенью пластичности. Эти мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (МСК) иногда называют **стволовыми клетками костного мозга**, и их потенции на данный момент остаются под вопросом (Bianco, 2014).

Первоначально выявленные в костном мозге (Friedenstein et al., 1968; Caplan, 1991) мультипотентные МСК впоследствии были обнаружены в многочисленных взрослых тканях (дерме, кости, жире, хрящах, сухожилиях, мышцах, тимусе, роговице, пульпе зуба и др.), а также в пуповине и плаценте (Gronthos et al., 2000; Chamberlain et al., 2004; Perry et al., 2008; Traggiai et al., 2008; Kuhn, Tuan 2010; Nazarov et al., 2012; Via et al., 2012). Обнаружение МСК в человеческой пуповине и молочных («детских») зубах позволило некоторым медикам предположить, что родители могут замораживать клетки из пуповины или выпавших зубов, чтобы использовать эти клетки для трансплантации позже². Являются ли МСК плюрипотентными, т. е. способными производить клетки всех зародышевых листков при введении в бластоцисту, показано еще не было.

Большая часть противоречий, касающихся МСК, связана с их «раздвоением личности»: они поддерживают пул стромальных клеток, с одной стороны, и стволовых клеток — с другой. Морфологически МСК напоминают фибробласты, секретирующие внеклеточный матрикс соединительной ткани. Однако в культуре МСК ведут себя иначе, чем фибробласты. Единичная МСК в культуре может размножиться и произвести популяцию клеток-клонов, которые могут быть использованы для формирования органов *in vitro* с разнообразными типами клеток (рис. 5.18;

¹ Первые попытки такой трансплантации показали включение ГСК в различные ткани, даже в мозг. Однако оказалось, что это было вызвано слиянием, а не фактическим происхождением линии от ГСК (см. Alvarez-Dolado et al., 2003 и веб-конференцию с участием Arturo Alvarez-Buylla, 2005).

² Еще одним аргументом в пользу сохранения клеток пуповины является то, что они содержат гемопоэтические стволовые клетки, которые могут быть пересажены ребенку, если у него позже разовьется лейкемия (Goessling et al., 2011).

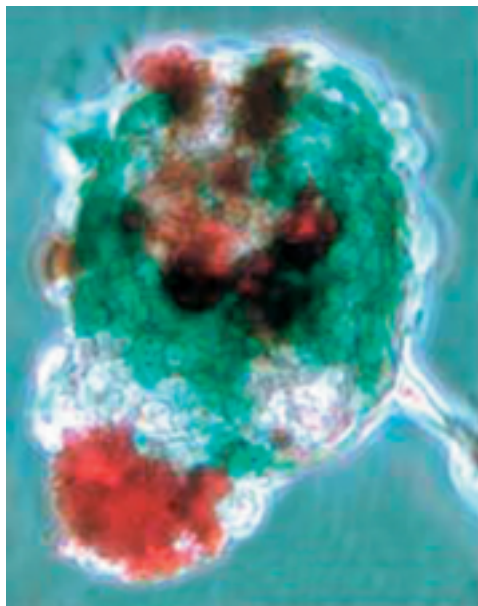
Из: S. Méndez-Ferrer et al., 2010, *Nature* 466: 829–834

Рис. 5.18. Мезенсфера, содержащая два типа клеток. Мезенхимные стволовые клетки, помещенные в культуру, образуют мезенсферы, способные производить различные типы клеток. Здесь мезенсфера содержит остеобласты (костеобразующие клетки; бирюзовый цвет) и адипоциты (жирообразующие клетки; красный цвет).

Sacchetti et al., 2007; Méndez-Ferrer et al., 2010; Bianco, 2014). Как было показано на костном мозге, МСК в других тканях могут выступать в качестве клеток-предшественников, а также поддерживать пул стволовых клеток в постоянной нише, возможно, с помощью паракринного сигналинга (Gnecchi et al., 2009; Kfoury, Scadden, 2015).

Регуляция развития МСК

Некоторые паракринные факторы, по-видимому, направляют развитие МСК по пути конкретной линии. Тромбоцитарный фактор роста (PDGF) имеет ключевое значение для образования жира и хондрогенеза, сигнализация TGF β также важна для хондрогенеза, а сигнализация фактора роста фибробластов (FGF) необходима для дифференцировки в костные клетки (Pittenger et al., 1999; Dezawa et al., 2004; Ng et al., 2008; Jackson et al., 2010). Паракринные сигнальные факторы могут лежать в основе не только дифференцировки МСК, но и их модуляции в постоянной нише стволовой клетки. Например, было показано, что МСК играют важную роль в качестве мультипотентных клеток-предшественников и регуляторов ниши стволовых клеток во время развития и регенерации волосных фолликулов (Kfoury, Scadden, 2015). Быстрое обновление эпидермиса и волосных фолликулов в коже требует стабильной активации постоянных стволовых клеток (см. гл. 16). Молодые жировые клетки-предшественники, окружающие ос-

нование растущего фолликула, необходимы и достаточны для активации стволовых клеток фолликулов с помощью паракринного механизма PDGF во время роста и регенерации кожи (Festa et al., 2011).

Дифференцировка МСК зависит не только от паракринных факторов, но и от молекул, которые содержатся в клеточном матриксе в нише стволовых клеток. Некоторые компоненты клеточного матрикса, особенно ламинин, по-видимому, удерживают МСК в недифференцированном стволовом состоянии (Kuhn, Tuan, 2010). Ряд исследований был посвящен изучению воздействий, которые физические свойства матрикса оказывают на МСК для получения *in vitro* различных производных клеточных типов из СК, растущих на определенных поверхностях. Например, если МСК человека выращивать на мягкой матрице коллагена, они дифференцируются в нейроны. Этот тип клеток МСК, по-видимому, не образуют *in vivo*. Если МСК культивировать на умеренно эластичной матрице коллагена, они становятся мышечными клетками, а на более твердых матрицах дифференцировка идет в сторону костных клеток (рис. 5.19; Engler et al., 2006). Пока неизвестно, является ли такой диапазон потенции нормой в организме. По мере совершенствования технологий ответы на эти вопросы могут быть получены в результате изучения свойств различных ниш МСК.

Модели систем человека для изучения развития и болезней

До этого момента мы акцентировали внимание на стволовых клетках *in vivo*. Однако способность к самообновлению и дифференцировке, определяющая стволовую клетку, также позволяет воздействовать на нее *in vitro*. До того как ученые научились культивировать эмбриональные стволовые клетки человека (Thomson et al., 1998), специалисты, изучавшие развитие человеческих клеток, использовали бессмертные (иммортиализированные) опухолевые клетки или клетки из тератокарцином — опухолей, возникающих из зародышевых клеток (Martin, 1980). Наиболее была изучена среди клеток человека клеточная линия HeLa, полученная из рака шейки матки Генриетты Лакс (рак забрал ее жизнь в 1951 г., а клеточная линия изолирована без ведома или согласия ее семьи)¹.



Загадки развития

Какие молекулярные механизмы могут управлять переходом МСК от функции предшественника к функции регулятора других стволовых клеток?

¹ История Генриетты Лакс, клеток HeLa в науке и социальной политике прекрасно описана в книге Ребекки Скютт (2010 г.) «Бессмертная жизнь Генриетты Лакс».

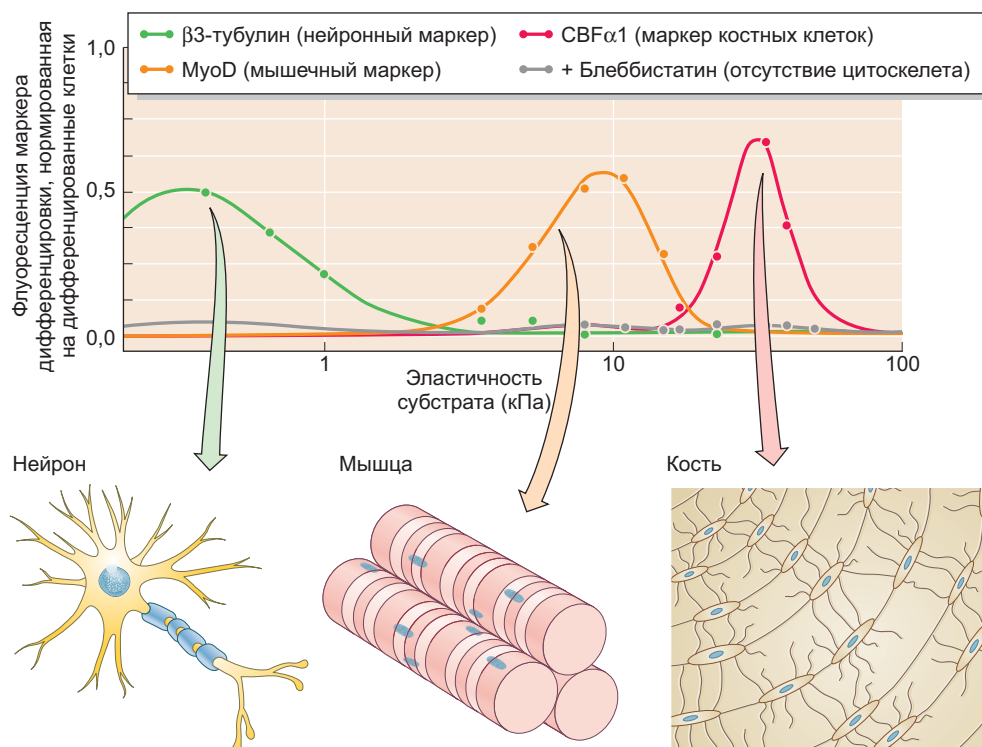


Рис. 5.19. На дифференцировку МСК влияет жесткость матриц, на которых они расположены. На покрытых коллагеном гелях, обладающих жесткостью, подобной жесткости мозга (около 0,1–1 кПа), МСК человека дифференцируются в клетки, содержащие нейронные маркеры (такие как β^3 -тубулин), но не в клетки, содержащие маркеры мышечных клеток (MyoD) или маркеры костных клеток (CBFA1). По мере того как гель становится жестче, МСК дифференцируются в клетки, экспрессирующие специфические для мышц белки, а еще более жесткие матрицы вызывают дифференцировку клеток с маркерами костных клеток. Дифференцировка МСК на любой матрице может быть остановлена с помощью блебистатина, ингибирующего сборку микрофиламентов. (По данным: A. J. Engler et al., 2006. *Cell* 126: 677–689.)

Плюрипотентные стволовые клетки в условиях лаборатории

Основным недостатком ранних исследований иммортализованных опухолевых клеток было то, что ни одна из использованных клеток не представляла собой модель нормальных человеческих клеток. На сегодняшний день с нашей возможностью выращивать эмбриональные и постнатальные стволовые клетки человека в лабораторных условиях и индуцировать их дифференцировку в различные типы клеток мы, наконец, имеем гибкую модельную систему для изучения развития и болезней человека *in vitro*.

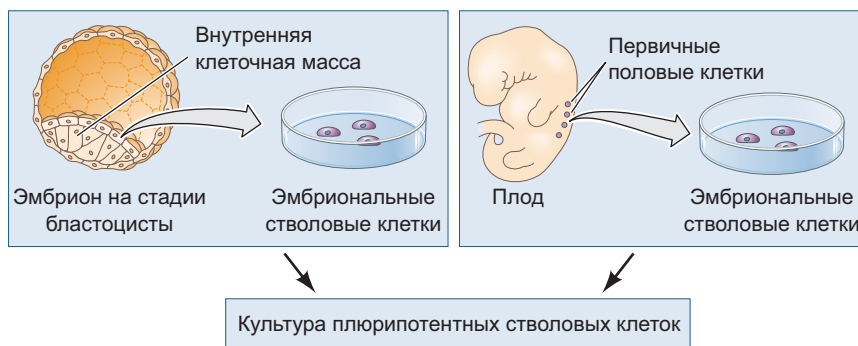
ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Плюрипотентные эмбриональные клетки — это особые клетки, способные дать начало всем типам клеток, необходимым для формирования тела взрослого организма (Shevde, 2012). В лаборатории плюрипо-

тентные эмбриональные клетки получают из двух основных источников: 1) ВКМ ранней бластоцисты, клетки которой можно поддерживать в культуре как клональную линию ЭСК (Thomson et al., 1998); 2) первичных половых клеток (ППК), которые еще не дифференцировались в сперматозоиды или яйцеклетки (рис. 5.20). Если ППК выделяют из эмбриона и выращивают в культуре, их называют эмбриональными половыми клетками или ЭПК (Shamblott et al., 1998).

Как и в ВКМ эмбриона, плюрипотентность ЭСК в культуре поддерживают одним и тем же набором трех транскрипционных факторов: Oct4, Sox2 и Nanog. Действуя согласованно, факторы активируют гены, необходимые для поддержания плюрипотентности и подавляют гены, отвечающие за дифференцировку (Marson et al., 2008; Young, 2011). Однако все ли плюрипотентные стволовые клетки эквивалентны? Годы экспериментов как с мышиными, так и с человеческими ЭСК показывали, что данные клетки плюрипотентны (Martin, 1981; Evans and Kaufman, 1981; Thomson et al., 1998), но впоследствии были выявлены различия в степени их само-

Рис. 5.20. Основные источники плюрипотентных стволовых клеток из раннего эмбриона. Эмбриональные стволовые клетки возникают в результате культивирования внутренней клеточной массы раннего эмбриона. Эмбриональные половые клетки получают из первичных половых клеток, которые еще не достигли половых желез



обновления, типах клеток, которые они могут формировать, и их характеристиках (Martello, Smith, 2014; Fonseca et al., 2015; Van der Jeught et al., 2015). По-видимому, эти различия основаны на незначительной разнице в стадиях развития исходных клеток ВКМ, из которых были получены культуры, что привело к обнаружению двух различных плюрипотентных состояний ЭСК: **наивного** и **праймированного**¹. **Наивные ЭСК** представляют собой незрелые недифференцированные ЭСК с наибольшим уровнем плюрипотентности. В отличие от них, **праймированные ЭСК** представляют собой ВКМ — клетки, начавшие созревать по пути эпибластов; следовательно, они праймированы, готовы к дифференцировке.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ФАКТОРЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭСК

Возникают все новые методы поддержания наивных ЭСК человека, полученных из клеток ВКМ или даже из праймированных ЭСК (Van der Jeught et al., 2015). Так, ЭСК культивируют в присутствии фактора ингибирования лейкемии (LIF) в комбинации по меньшей мере с двумя ингибиторами киназы (называемыми 2i), ассоциированными с ингибитором MAPK/ErK-пути (MEKi) и ингибитором киназы гликогенсинтазы 3 (GSK3i) (Theunissen et al., 2014). Эти факторы наряду с дополнительными условиями необходимы для предотвращения дифференцировки и сохранения ЭСК в наивном состоянии.

На сегодняшний день специалисты изучают генные сети, эпигенетические модуляторы, паракринные факторы и молекулы адгезии, необходимые для дифференцировки ЭСК. Эти клетки могут реагировать на специфичные комбинации и последовательное влияние факторов роста, способные повести их дифференцировку по направлению определенного клеточного развития в пределах одного из трех зародышевых листков (**рис. 5.21**; Murry, Keller, 2008). Например, использование определенной ростовой среды для культивирования монослоя ЭСК может подтолкнуть их по мезодермальному пути развития. Когда за этим следует период активации Wnt, а затем ингибирование

? Загадки развития

Какие возможности открываются теперь, когда наивные ЭСК человека могут быть изолированы и сохранены? Плюрипотентность этих клеток может быть доказана трансплантацией наивных человеческих ЭСК в морулу мыши: трансплантированные клетки дифференцируются во многие типы клеток внутри межвидового химерного эмбриона мыши (Gafni et al., 2013). Хотя федеральные фонды не могут быть использованы для создания химер человека и мыши в США, такие правила отсутствуют в других странах. Теоретически возможно вырастить ВКМ человека из наивных ЭСК человека при поддержке трофобласта мыши. Как минимум это позволило бы провести первое прямое исследование гастрুলации человека. Следует ли таким образом изучать человеческую гастралу? Какие этические проблемы могут возникнуть в результате таких исследований?

Wnt, клетки дифференцируются в сократительные клетки сердечной мышцы (Burridge et al., 2012; 2014). ЭСК, направленные по эктодермальному пути с помощью ингибирования Bmp4, Wnt и активина, могут быть впоследствии индуцированы факторами роста фибробластов (FGF) для получения нейронов (**рис. 5.21**; Kriks et al., 2011).

Физические ограничения среды, в которой культивируют ЭСК, также могут оказывать серьезное влияние на их дифференцировку. Ограничение площади роста клеток до поверхности малого размера диска² может само по себе инициировать паттерн

¹ При анализе ранних исследований ЭСК важно критически рассматривать плюрипотентное состояние ЭСК, описываемое в каждой работе. Являются ли ЭСК наивными и какие последствия это может иметь для интерпретации результатов авторами? Наивные ЭСК иногда упоминают как находящиеся в «основном состоянии».

² Исследователи наносили микропаттерн адгезивного субстрата на стеклянную пластинку, ограничивающую рост клеток до определенного размера и формы, для систематического анализа (Warmflash et al., 2014). В другой работе выровненные сетчатые субстраты способствовали дифференцировке ЭСК в дофаминовые нейроны (Tan et al., 2015).

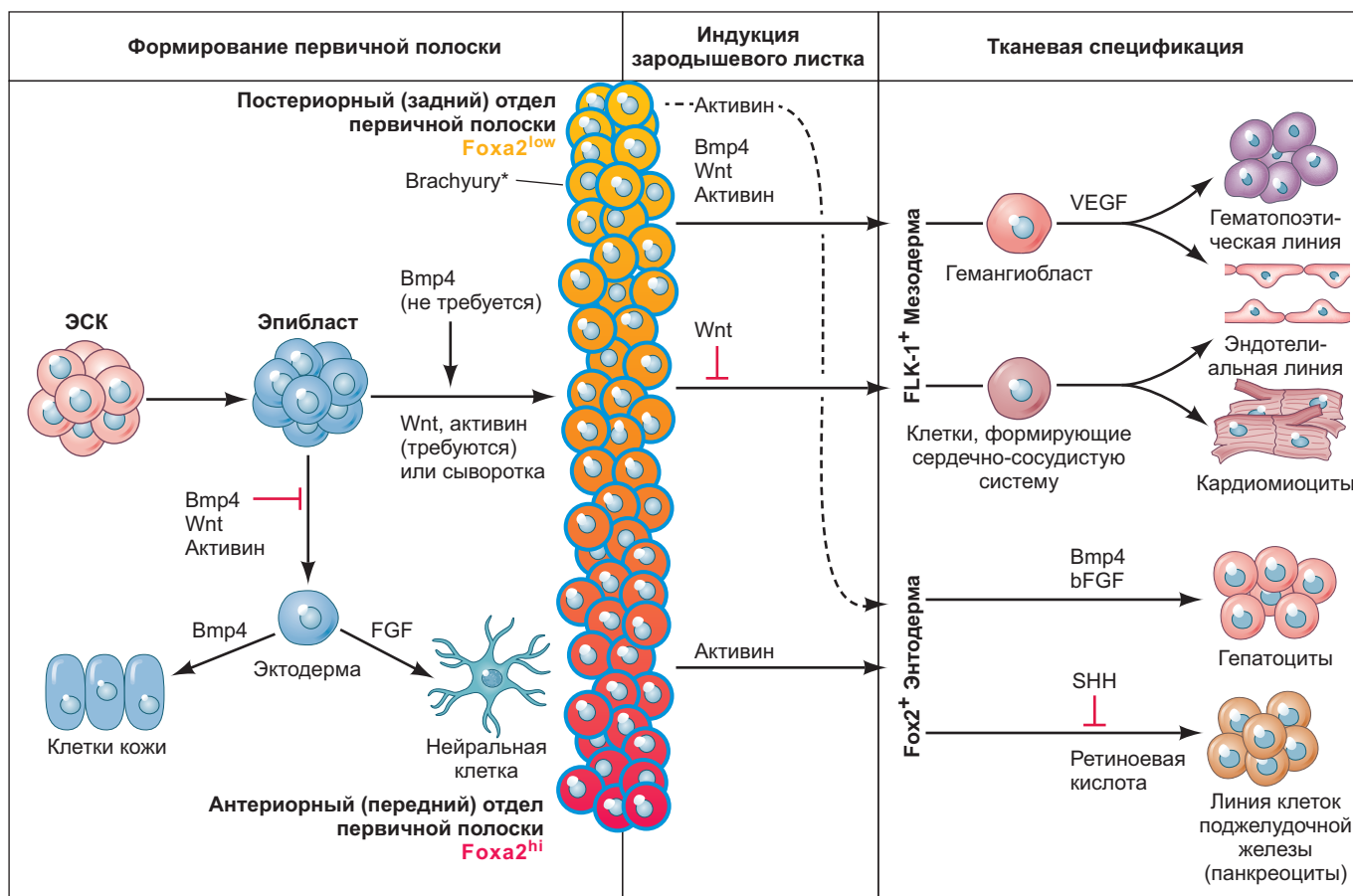
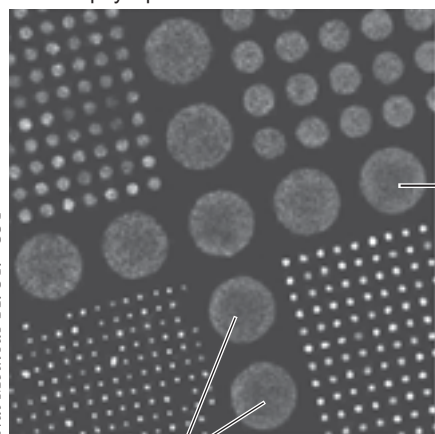


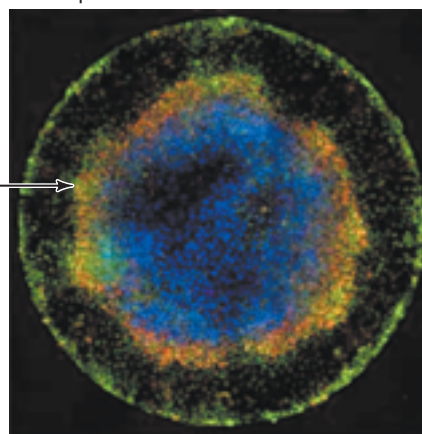
Рис. 5.21. Индукция дифференцировки стволовых клеток из ЭСК. Подобно этапам дифференцировки, которые клетки эпибласта проходят во время своего созревания в эмбрионе млекопитающего, в культуре можно индуцировать дифференцировку ЭСК в клетки всех зародышевых листков с помощью различных факторов (паракринных и транскрипционных в том числе). В результате ингибирования нескольких факторов роста ЭСК может давать линии клеток эктодермы; однако для развития линий мезодермы или энтодермы ЭСК сначала индуцируют дифференцировку в клетки со свойствами первичной полоски, с помощью таких паракринных факторов, как Wnt, Bmp4 или активин, в зависимости от требуемого типа дифференцированных клеток. (По данным: С. Е. Murry and G. Keller, 2008. *Cell* 132: 661–680.)

А Культуры, выращенные на дисках с микроузорами



Микродиски

Б Радиальное распределение экспрессии генов



■ Эктодерма (Sox2⁺)
 ■ Трофобласт (Cdx2⁺)
 ■ Мезодерма (Bra⁺)

Рис. 5.22. Для ЭСК человека, выращенных на дисках с нанесенными микроузорами, была показана дифференциальная экспрессия генов, схожая с экспрессией в раннем эмбрионе

дифференциальной экспрессии генов в колонии клеток, который коррелирует с таковым у раннего эмбриона (рис. 5.22; Warmflash et al., 2014). Невероятное число паттернов может быть инициировано исключительно геометрией и размерами подложки. Достижения метода позволяют проводить дальнейшее изучение структуры и функций конкретных типов клеток человека, а также использовать их в медицинских целях.

ЭСК И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА

Основная цель исследования стволовых клеток человека — разработать новые методы лечения заболеваний и восстановления после повреждений. Фактически плюрипотентные стволовые клетки открыли совершенно новую область терапии, получившую название регенеративной медицины (Wu, Hochelinger, 2011; Robinton, Daley, 2012). Терапевтические возможности ЭСК заключаются в их способности дифференцироваться в любой тип клеток, что особенно важно для лечения состояний, при которых постнатальные клетки дегенерируют (таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, диабет и цирроз печени). Например, обнаружено, что ЭСК человека способны лечить повреждения моторных нейронов у взрослых крыс как путем дифференцировки в новые нейроны, так и путем выработки паракринных факторов (BDNF и TGF β), которые предотвращают гибель существующих нейронов. Аналогично, клетки — предшественники секретирующих дофамин нейронов, полученных из ЭСК (Kriks et al., 2011), были способны завершить свою дифференцировку в дофаминергические нейроны и вылечить паркинсоноподобные состояния, когда они были имплантированы в мозг мышей, крыс и даже обезьян.

Хотя потенциальная терапия с использованием стволовых клеток существует, другое направление исследований позволяет изучать механизмы развития болезней и оценивать эффективность фармацевтических препаратов. Так, уже увеличился объем знаний о редких заболеваниях крови, например анемии Фанкони, вызывающей недостаточность костного мозга и последующую потерю красных и белых кровяных телец (Zhu et al., 2011). Часто такие заболевания вызваны **гипоморфными мутациями** — мутациями, которые просто снижают функцию гена, в отличие от «нулевой» мутации, приводящей к полной потере функции белка. Исследователи использовали ЭСК человека для создания модели анемии Фанкони с помощью RNAi для *нокдауна* (не *нокаута*) специфичных изоформ генов анемии Фанкони (Tulpule et al., 2010). Полученные результаты позволили по-новому взглянуть на роль генов, отвечающих за развитие анемии Фанкони на начальных этапах эмбрионального кроветворения.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки

Хотя известно, что ядра дифференцированных соматических клеток сохраняют копии всего генома индивидуума, биологи уже давно знали, что потенция подобна спуску с крутого холма, она необратима. Предполагалось, что после дифференцировки клетка не может вернуться в незрелое и более пластичное состояние. Однако наши новые знания о транскрипционных факторах, необходимых для поддержания плюрипотентности, открыли поразительно простой способ перепрограммирования соматических клеток в эмбриональные стволовые клетки.

В 2006 г. в Университете Киото продемонстрировали, что путем введения активированных копий четырех генов, кодирующих некоторые ключевые факторы транскрипции, почти любая клетка в организме взрослой мыши может быть превращена в **индуцированную плюрипотентную стволовую клетку** (ИПСК) с плюрипотентностью ЭСК. Этими генами были *Sox2* и *Oct4* (они активировали *Nanog* и другие факторы транскрипции, устанавливающие плюрипотентность и блокирующие дифференцировку), *c-Myc* (он открыл хроматин и сделал гены доступными для *Sox2*, *Oct4* и *Nanog*) и *Klf4* (он предотвращает гибель клеток; см. рис. 3.14).

В течение 6 месяцев после публикации этой работы (Takahashi, Yamanaka, 2006) три группы ученых сообщили, что одни и те же или схожие факторы транскрипции могут индуцировать плюрипотентность в различных дифференцированных клетках человека (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007; Park et al., 2008). Подобно ЭСК, линии клеток ИПСК могут размножаться бесконечно и, как в культуре, так и в тератоме, образуют типы клеток, относящиеся ко всем трем зародышевым листкам. К 2012 г. методы культивирования позволили сделать экспрессию генов мышинных ИПСК почти идентичной экспрессии генов ЭСК мыши (Stadtfield et al., 2012). Наиболее важным было то, что целые мышинные эмбрионы могли быть получены из одной ИПСК, что указывает на полную плюрипотентность. Хотя ИПСК функционально плюрипотентны, они лучше всего генерируют клетки органа, из которого произошла родительская соматическая клетка (Moad et al., 2013). Эти данные свидетельствуют о том, что, подобно наивным клеткам ЭСК, не все ИПСК одинаковы и что они могут сохранять эпигенетическую память о своей прошлой локализации.

ПРИМЕНЕНИЕ ИПСК В РАЗВИТИИ ЧЕЛОВЕКА И ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНЕЙ

Использование ИПСК дает возможность проводить исследования на пораженных тканях человека, избегая при этом осложнений, связанных с использованием ЭСК человека. В настоящее время индуцированные

плюрипотентные стволовые клетки необходимы для: 1) создания пациентспецифичных ИПСК при изучении патологий; 2) сочетания генной терапии с использованием пациентспецифичных ИПСК при лечении болезней; 3) использования клеток-предшественников, полученных от пациентспецифичных ИПСК, для трансплантации без осложнений в виде иммунного отторжения; 4) использования дифференцированных клеток, полученных от пациентспецифичных ИПСК, при скрининге лекарственных препаратов.

Трансплантация клеток, полученных из мышечных ИПСК, обратно в мышцу-донора не вызывает иммунного отторжения (Guha et al., 2013). На основании этого можно предположить, что использование ИПСК действительно перспективная терапия¹. На сегодняшний день наиболее значительные успехи, связанные с ИПСК, достигнуты в области моделирования заболеваний человека. После крупного исследования (Park et al., 2008), в ходе которого получили ИПСК из клеток пациентов с 10 различными заболеваниями, другие исследовательские группы использовали технологию ИПСК для моделирования широкого спектра заболеваний, включая синдром Дауна и диабет (Singh et al., 2015).

Подобная методика имеет особое значение при изучении болезней, которые нелегко моделировать в организмах животных. Мыши, например, не заболевают тем же типом муковисцидоза (заболевание, серьезно ухудшающее функцию легких), что и люди. После открытия факторов, вызывающих дифференцировку ИПСК мыши в легочную ткань (Mou et al., 2012), у человека с муковисцидозом отобрали клетки, получили ИПСК и превратили их в легочный эпителий, обладающий свойствами человеческого муковисцидоза. Зная, что муковисцидоз часто вызван мутациями в пределах одного гена (ген трансмембранного регулятора проводимости CF, который кодирует структуру канала, транспортирующего хлор; Riordan et al., 1989; Kerem et al., 1989), исследователи стремились исправить эти мутации, используя гомологичную рекомбинацию для репарации дефекта в ИПСК. Крейн и др. (2015) выполнили эту задачу на ИПСК, полученных от пациента с муковисцидозом; как только мутация муковисцидоза была исправлена в данной культуре, удалось индуцировать формирование функциональных хлорных каналов в данных клетках. Следующим шагом будет тестирование этого подхода *in vivo* на животных, чтобы увидеть, можно ли рассмотренный метод использовать для лечения муковисцидоза у людей.

Преимущества сочетания использования ИПСК и генной терапии продемонстрировала группа Рудольфа Джениша в 2007 г., вылечив серповидноклеточную анемию у мышей. Это заболевание вызвано мутацией в гене гемоглобина. Сотрудники лаборатории получили ИПСК от мыши, исправили мутацию в гене гемоглобина (заменив одну пару оснований), а затем дифференцировали ИПСК в гемопоэтические

стволовые клетки, имплантация которых заменила серповидноклеточный фенотип (рис. 5.23, Hanna et al., 2007). Текущие исследования позволяют определить, могут ли подобные методы вылечить такие заболевания человека, как диабет, макулярная дегенерация, травма спинного мозга, болезни Паркинсона и болезнь Альцгеймера, а также болезни печени и сердца. Сперматозоиды и яйцеклетки тоже были получены из мышечных ИПСК. Сначала из фибробластов кожи получили ИПСК, а затем их дифференцировали в первичные половые клетки (ППК). Когда полученные ППК агрегировались с тканями гонад, клетки проходили через мейоз и становились функциональными гаметами (Hayashi et al., 2011; Hayashi et al., 2012). Эта работа, возможно, имеет огромное значение для лечения многих типов бесплодия, а также для того, чтобы позволить ученым изучать детали мейоза.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

МОДЕЛИРОВАНИЕ МУЛЬТИГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИПСК

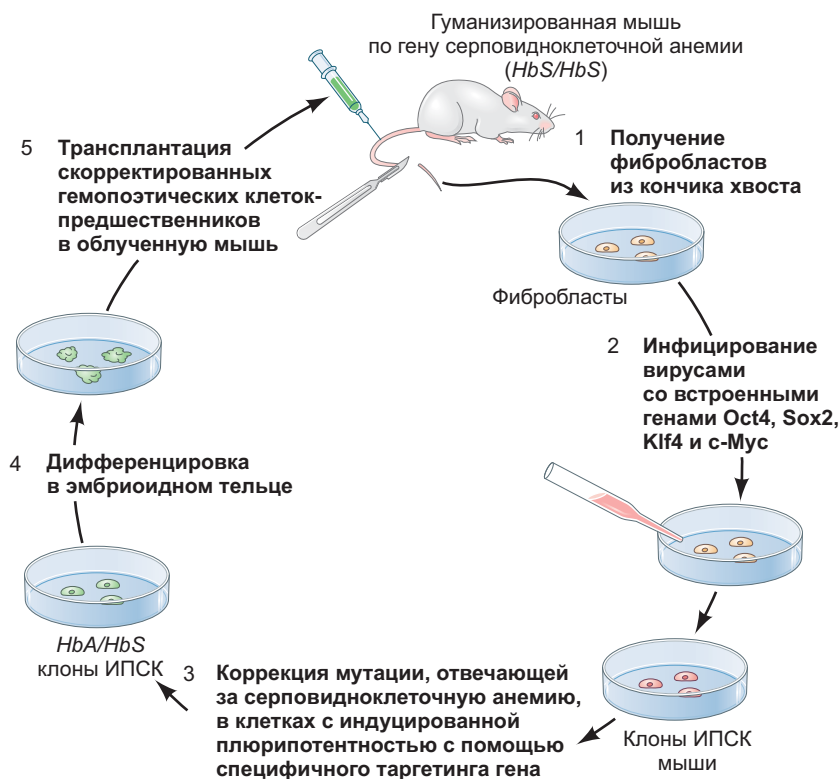
Одна из главных проблем в изучении болезней человека заключается в том, что люди различаются по репертуару генов, связанных с болезнью, а также по срокам начала и прогрессирования заболевания. К счастью, ИПСК предоставили новый инструмент для преодоления этого препятствия. Здесь мы освещаем использование ИПСК при изучении двух особенно сложных и мультигенных заболеваний нервной системы, которые находятся на противоположных концах периода развития: расстройства аутистического спектра и бокового амиотрофического склероза (БАС), называемого также болезнью Лу Герига.

Расстройства аутистического спектра представляют собой ряд нервных дисфункций, обычно влияющих на социальные и когнитивные способности, которые четко не проявляются до трехлетнего возраста². Расстройства, попадающие в этот спектр, включают классический аутизм, синдром Аспергера, синдром ломкой X-хромосомы и синдром Ретта. Последний, по-видимому, связан с определенным геном (*метилированный CpG-связывающий белок-2*, или *MeCP2*). Аутизм, напротив, является мультиаллельным, причем у некоторых детей проявляется несиндромный (аутизм без известной причины), и, вероятно, они

¹ В настоящее время высокая стоимость производства клеток от ИПСК в количестве, необходимом для эффективной терапии, — существенное препятствие для развития этого метода в медицинских целях.

² Хотя некоторые расстройства аутистического спектра не выражены ярко на начальных стадиях, выявляются ранние их признаки, такие как пристальное разглядывание геометрических фигур вместо лиц людей.

Рис. 5.23. Протокол лечения болезни человека у мыши с использованием ИПСК и метода рекомбинации. (1) Фибробласты кончика хвоста взяты от мыши, геном которой содержит аллели серповидноклеточной анемии человека и не содержит мышинных генов этого белка. (2) Клетки культивируют и заражают вирусами, содержащими четыре транскрипционных фактора, индуцирующих плюрипотентность. (3) ИПСК определяют по их отличительной форме и получают ДНК, содержащую аллель дикого типа человеческого глобина. (4) Эмбрионы культивируют; они образуют эмбриоидные тельца, содержащие кроветворные стволовые клетки. (5) Гемопоэтические предшественники и стволовые клетки из этих эмбриоидных телц вводят в исходную мышь после облучения (облучение необходимо, чтобы убрать собственные гемопоэтические стволовые клетки мыши). Этот метод излечивает серповидноклеточную анемию у мышей. (По данным: J. Hanna et al., 2007. *Science* 318: 1920–1923.)



обладают спорадическими мутациями (Iossifov et al., 2014; Ronemus et al., 2014; De Rubeis, Buxbaum, 2015). На самом деле ряд факторов (генетика и факторы окружающей среды) могут оказывать уникальное воздействие на каждого аутичного ребенка, что вызывает значительные трудности для исследования аутизма.

Один из способов состоит в том, чтобы получить ИПСК от как можно большего числа детей с аутизмом для более полного понимания ассоциированных генов. Этому методу способствовала программа под названием «Зубная фея», в рамках которой было получено достаточное количество пульпы молочных детских зубов для получения ИПСК¹. При использовании ИПСК ребенка с не-синдромным аутизмом исследователи получили культуру нейронов и обнаружили мутацию в гене TRPC6 кальциевого канала, важного для функционирования этих нейронов (Griesi-Oliveira et al., 2015). Они продемонстрировали также улучшение нейронной функции после воздействия на эти клетки гиперфорина — соединения, найденного в зверобое и известного тем, что оно стимулирует ток кальция. Оказывается, экспрессию *TRPC6*

можно регулировать MeCP2, что подтверждает прямую генетическую связь между аутизмом и синдромом Ретта. Метод лечения для этого ребенка был подобран индивидуально, что подчеркивает потенциальную эффективность индивидуального лечения пациента. Эти результаты показывают, что ИПСК могут играть важную роль в моделировании комплексного заболевания для исследования механизмов его возникновения.

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — это дегенеративное заболевание двигательных нейронов взрослого человека, мультиаллельное в силу семейного наследования, а также спорадической мутации; к сожалению, оно не поддается лечению. Некоторые первые специфические ИПСК были получены от пациентов с БАС в 2008 г. лабораторией Кевина Эггана (Dimos et al., 2008). БАС-производные ИПСК могут быть дифференцированы в моторные нейроны и другие типы клеток, например астроциты, также обладающие фенотипом БАС. Совсем недавно нейроны, дифференцированные из ИПСК, содержащих мутацию БАС, демонстрировали типичные признаки патологии БАС (Egawa et al., 2012). Исследователи использовали дифференцированные двигательные нейроны для скрининга лекарств, способных улучшить состояние моторных нейронов, и идентифицировали ингибитор гистоновой ацетилаз, снижающий клеточные фенотипы БАС. Таким образом, эксперименты с ИПСК позволили по-новому взглянуть на то, как можно эпигенетически регулировать и, возможно, лечить БАС.

¹ См. работы Алиссон Муотри (A. Muotri) и проект «Зубная фея» в видеоролике «обращение вспять аутизма в лаборатории с помощью стволовых клеток и Зубной феи», который можно найти в интернете по названию. Кроме того, вы можете получить доступ к конференции BioWeb, в которой А. Муотри рассматривает моделирование БАС и аутизма с помощью ИПСК.

Органоиды: изучение органогенеза человека в культуральной чашке

Мы обсудили множество способов использования плюрипотентных стволовых клеток (ЭСК и ИПСК) для понимания развития человека и болезней на уровне клетки, но существует огромная разница между клетками в культуре и клетками эмбриона. С помощью человеческих бластоцистов обычно исследовали раннее развитие человека и лечили бесплодие, однако использование эмбрионов человека для изучения нашего органогенеза было технически невозможно и рассматривалось большинством как неэтичное. Тем не менее благодаря недавним достижениям в технике культивирования плюрипотентных клеток удалось вырастить рудиментарные органы

из плюрипотентных стволовых клеток. На сегодняшний день наиболее сложными созданными структурами являются центр слепого пятна глаза, мини-кишечник, ткани почек, печени и даже области мозга (рис. 5.24А; Lancaster, Knoblich, 2014).

Эти **органоиды**, как их называют, обычно имеют размер горошины и могут сохраняться в культуре более года. Поразительная особенность органоидов заключается в том, что они фактически имитируют эмбриональный органогенез. Плюрипотентные клетки часто самоорганизуются в агрегаты на основе дифференциальной адгезии (во многом как при гаструляции; см. гл. 4), что приводит к сортировке и дифференцировке клеток с различными потенциалами развития, которые взаимодействуют, образуя ткани органа (рис. 5.24Б). Органоиды были

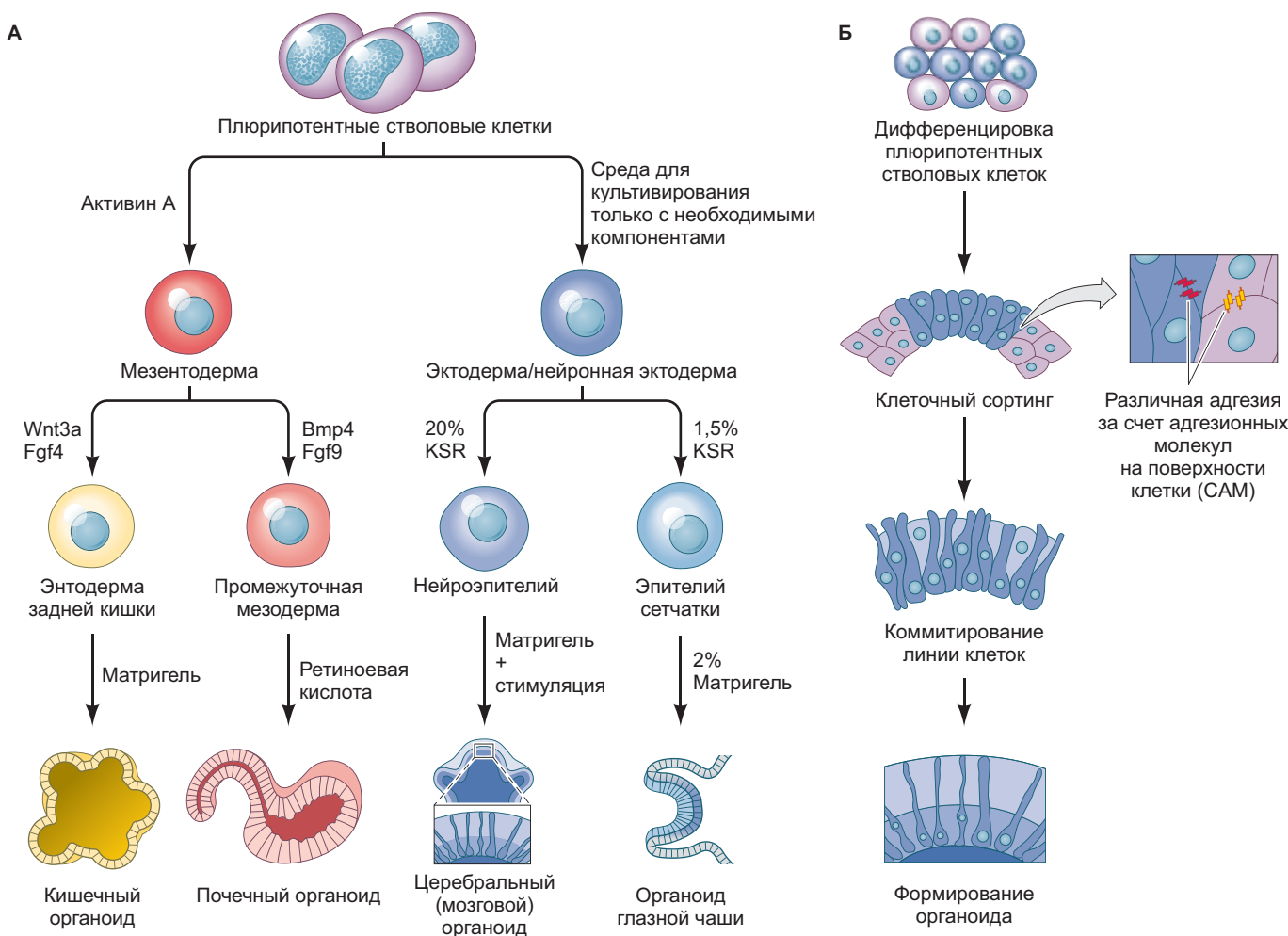


Рис. 5.24. Формирование органоидов. **А.** На схеме представлены различные стратегии, используемые для индукции формирования органоидов со специфичными типами тканей. В большинстве случаев используют трехмерную матрицу (Matrigel). KSR используют вместо нокаутующей сыворотки крови. **Б.** Процесс образования органоидов начинается с дифференциальной экспрессии генов, что приводит к появлению клеток с различными молекулами клеточной адгезии. Они наделяют клетки способностью к самоорганизации (см. гл. 4). После сортировки клетки продолжают созревать в направлении различных линий, которые взаимодействуют между собой и формируют функциональную ткань. (По данным: M. A. Lancaster and J. A. Knoblich, 2014. *Science* 345: 124–125.)

Загадки развития

Мы обсуждали моделирование болезней человека с помощью стволовых клеток, но можно ли изучать эволюцию позвоночных в чашке? Исследователи, например Алиссон Муотри, интересуются тем, как ИПСК, полученные от людей и различных приматов, различаются по поведению, самообновлению и потенциям. Путем сравнения транскриптомов и физиологии полученных типов клеток различных видов мы можем получить новые представления об эволюции человека. Какие конкретные вопросы вы бы задали и каковы были бы ваши прогнозы?

получены как из ЭСК, так и из ИПСК от здоровых и больных людей. Таким образом, терапевтические подходы, которые мы обсуждали для ЭСК и ИПСК, могут быть применены и к системе органоидов. Хотя на данный момент такое мнение кажется спекулятивным, создание органоидов может стать рабочим методом для выращивания аутологичных¹ структур, причем не только в заместительной клеточной терапии у специфичных пациентов, но и для пересадки тканей. В качестве примера в разделе «Развиваем тему» мы опишем некоторые замечательные особенности, связанные с развитием церебрального органоида и его использованием при моделировании врожденного заболевания головного мозга.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ЦЕРЕБРАЛЬНЫЙ ОРГАНОИД

Кора головного мозга человека, возможно, самая сложная ткань в животном мире, поэтому попытка искусственно создать даже часть этой структуры кажется сложной задачей. Но нейральная дифференцировка плюрипотентных клеток является своего рода «дифференцировкой по умолчанию», так же как и в случае с презумптивными нервными клетками гастротомии. Многие исследования, направленные на изучение развития плюрипотентных стволовых клеток в нервных тканях, способствовали разработке методов культивирования мультирегиональных органоидов мозга (Eiraku et al., 2008; Muguruma et al., 2010; Danjo et al., 2011; Eiraku and Sasai, 2012; Mariani et al., 2012). В относительно простых условиях плюрипотентные клетки самоорганизуются в небольшие сферические скопления, называемые эмбриоидными тельцами, и клетки внутри этих телец дифференцируются в нейроэпителий, подобный нейральному эпителию эмбриона. Способность плюрипотентных клеток образовывать трехмерные нейроэпителиальные структуры свидетельствует о том, что существуют устойчивые внутренние механизмы, которые праймируют нейральное развитие (Harris et al., 2015).

Как видно из большинства взрослых ниш нервных стволовых клеток, нейроэпителий поляризован вдоль апикально-базальной оси и способен развиваться в ткань мозга.

В основополагающем исследовании ученые вывели структуру органоидов мозговой ткани на следующий уровень сложности (Lancaster et al., 2013). Они помещали эмбриоидные тельца в капли матригеля (матрикс, изготовленный из солилизованной базальной мембраны; ЭСК обычно находятся на базальной стороне эпителия), чтобы обеспечить трехмерную структуру. Затем эти нейроэпителиальные структуры переместили в наполненный средой вращающийся биореактор (рис. 5.25А; Lancaster and Knoblich, 2014). Движение органоида в такой трехмерной системе необходимо для увеличения площади поглощения питательных веществ, которые поддерживают рост, необходимый для развития мультирегионального церебрального органоида. Получали слоистую ткань, характерную для различных областей мозга, включая соответствующие нейронные и глиальные клеточные маркеры (рис. 5.25В). Церебральные органоиды содержали клетки, примыкающие к желудочковидным структурам, что похоже на развивающуюся нервную трубку и даже нишу стволовых клеток, рассмотренную выше (рис. 5.25В). Клетки радиальной глии человека внутри церебрального органоида обладали всеми паттернами характерного поведения: симметричным делением для расширения ниши стволовых клеток и асимметричным делением для дальнейшей дифференцировки (Lancaster et al., 2013).

Группа Кноблича тоже создавала ИПСК из образцов фибробластов пациента с тяжелой микроцефалией в надежде, что удастся изучить патологические процессы, связанные с этим заболеванием (Lancaster et al., 2013). Микроцефалия — это врожденное заболевание, характеризующееся значительным уменьшением размеров головного мозга (рис. 5.26А). Примечательно, что церебральные органоиды у такого пациента действительно обладали хуже развитыми тканями, но в наружных слоях тканей было обнаружено повышенное количество нейронов, по сравнению с контрольными органоидами (рис. 5.26Б). Исследователи выявили у пациента мутацию в гене CDK5RAP2² — белка,

¹ Аутологичные, т. е. полученные от одного и того же организма. В этом случае клетки пациента перепрограммируются в ИПСК, которые развиваются в определенный органоид. Клетки и целые ткани из органоида могут быть пересажены обратно к тому же пациенту без риска возникновения иммунного отторжения.

² Cdk5-ассоциированный белок 2 (CDK5RAP2) кодирует центросомный белок, взаимодействующий с митотическим веретеном во время деления.

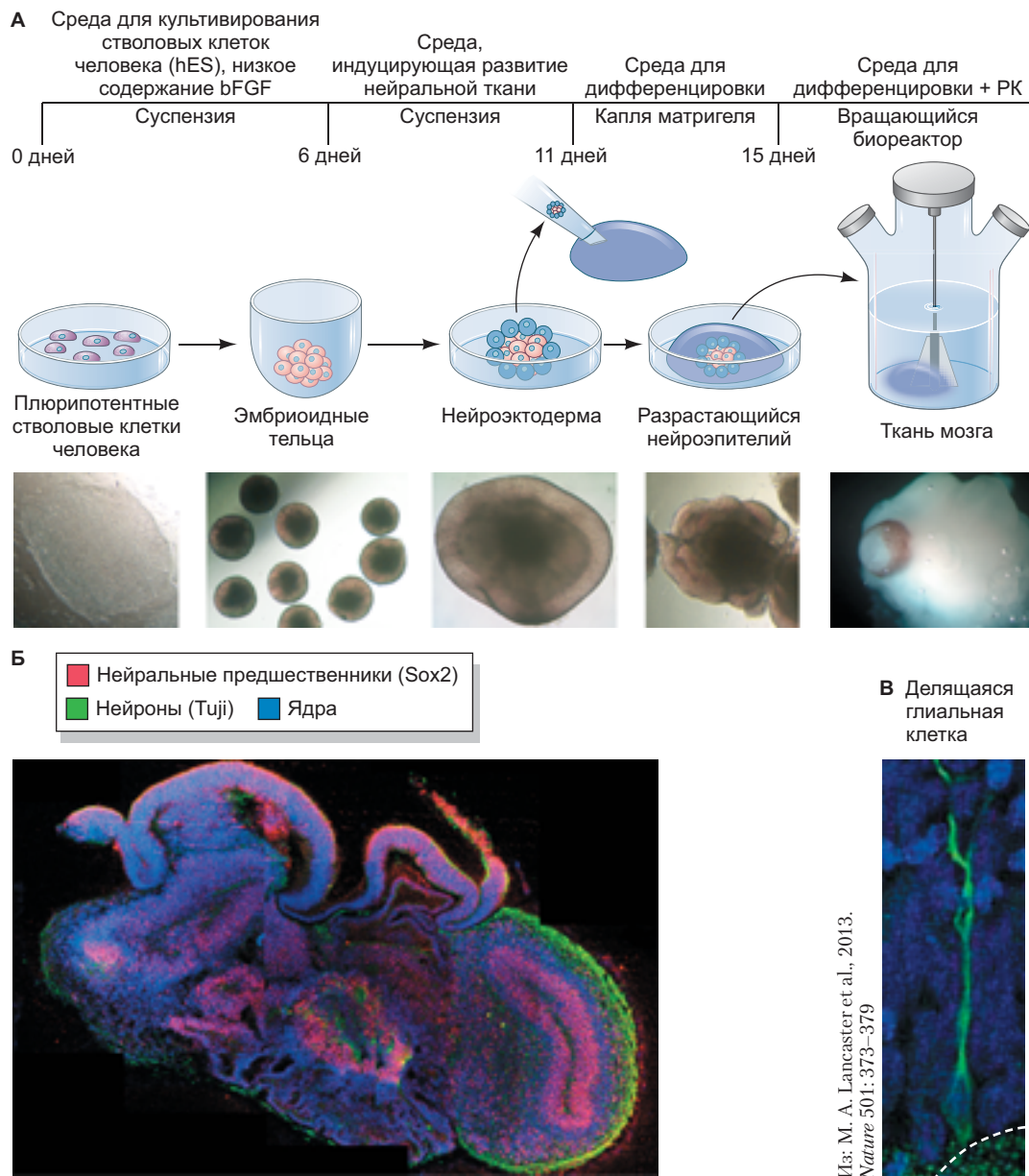


Рис. 5.25. Мозговой органоид. **А.** Показаны этапы его формирования от исходной клеточной суспензии до роста в биореакторе, вращающемся с малой скоростью. Репрезентативные изображения каждого этапа, полученные с помощью светового микроскопа, представлены под схемой. **Б.** Срез церебрального органоида, окрашенный на маркеры нейральных предшественников (Sox2, красный), нейронов (Tuji, зеленый) и ядер (синий), показывает многослойную организацию, характерную для развивающейся коры головного мозга. **В.** Радиальная глиальная клетка, меченная р-Виментином (зеленый), делится и обладает характерной морфологией: длинным базальным отростком и апикальной частью в просвете желудочков (белая пунктирная линия). (По данным: M. A. Lancaster et al., 2013. *Nature* 501: 373–379.)

необходимого для нормального функционирования митотического веретена деления. Более того, у радиальных глиальных клеток в этом органоиде наблюдали аномально низкие уровни симметричных делений (рис. 5.26В).

Напомним, что одной из основных функций стволовой клетки является деление. По-видимому,

CDK5RAP2 важен для деления, необходимого при расширении пула стволовых клеток. Отсутствие симметричных делений приводит к преждевременной дифференцировке нейронов, что объясняет увеличение числа нейронов в органоиде при меньшем объеме тканей (Lancaster et al., 2013).

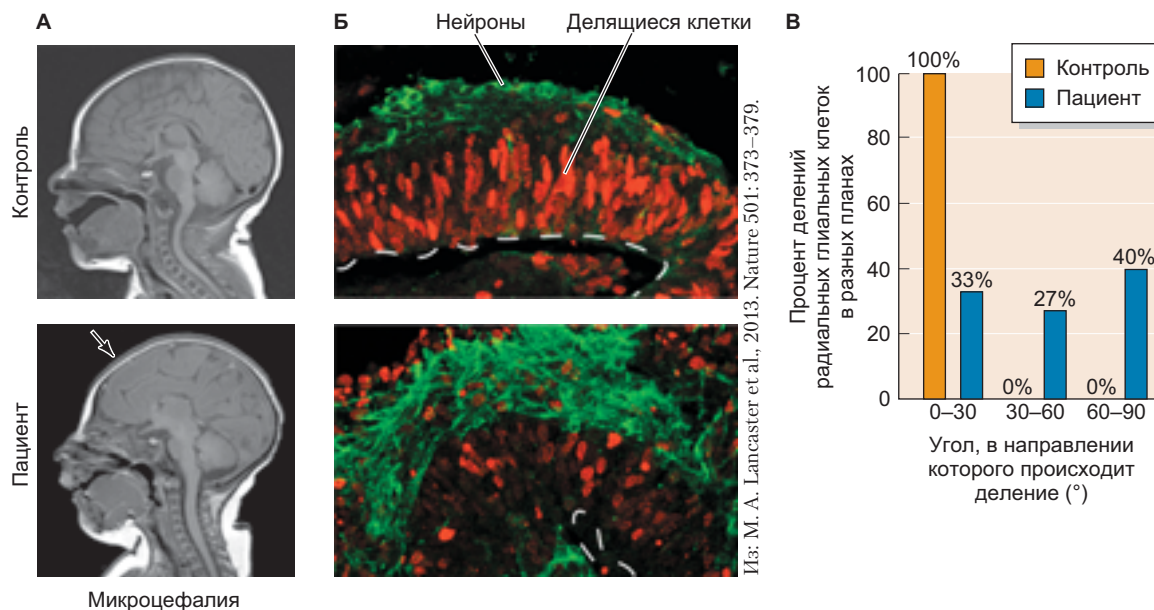


Рис. 5.26. Моделирование микроцефалии человека с помощью специфического для пациента церебрального органоида. **А.** Сагиттальный ракурс результатов МРТ мозга, в норме (*вверху*) и в случае микроцефалии (*внизу*) при рождении. У пациента меньший размер мозга и уменьшенная складчатость мозга (*стрелка*). **Б.** Иммуноцитохимическое окрашивание контрольных и полученных от пациентов церебральных органоидов. Нейроны (*зеленые*) и делящиеся клетки (*красные*) помечены DCX и BrdU соответственно. В органоиде, полученном от пациента, снижена пролиферация и увеличено число нейронов. **В.** Определение числа радиальных глиальных клеток, находящихся на этапе митотического деления, в разных плоскостях относительно апикально-базальной оси органоида. Из-за потери CDK5RAP2 радиальные глиальные клетки пациента делятся случайным образом по всем осям. (По данным: M. A. Lancaster et al., 2013. *Nature* 501: 373–379.)

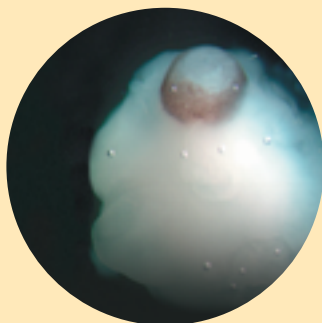
Стволовые клетки: надежда или шумиха?

Разработка методов индукции, изоляции и манипуляции стволовыми клетками — перспективное направление регенеративной медицины, позволяющее с помощью стволовых клеток пациента искусственно выращивать органы для замены их у больного. Стволовые клетки предоставляют также возможности для лечения многочисленных заболеваний. Действительно, если задуматься о механизмах старения, замещения больных тканей организма и даже повышения способностей, грань между медициной и научной фантастикой становится тонкой. Биологи развития должны учитывать не только биологию стволовых клеток, но и этические и экономические аспекты их использования (Faden et al., 2003; Dresser, 2010; Buchanan, 2011).

Несколько лет назад протоколы терапии стволовыми клетками были протестированы на людях лишь в ряде исследований (Normile, 2012; Cyranoski, 2013). На сайте clinicaltrials.gov будет раскрыт растущий

список проводимых исследований со стволовыми клетками (в 2018 г. около 7000). Несмотря на то что большинство современных клинических исследований проводят с использованием стволовых клеток, в США и других странах проводят исследования предшественников, полученных из человеческих ЭСК (51/~7000) и ИПСК (81/~7000). Серьезную озабоченность вызывает увеличение числа предлагаемых мошеннических методов лечения стволовыми клетками. Международное общество по исследованию стволовых клеток (www.isscr.org) предоставляет ценные ресурсы для их изучения и определения способов лечения стволовыми клетками, используемых сегодня.

Изучение стволовых клеток может стать началом революции, важной для медицины (и столь же важной для общества) и для исследования возбудителей различных инфекций. Однако помимо потенциала для медицинского применения роль стволовых клеток в том, что они могут рассказать, как устроен организм и как он поддерживает свою структуру. Стволовые клетки, безусловно, подтверждают мнение о том, что «развитие никогда не останавливается».



Из: M. A. Lancaster et al. 2013.
Nature 501: 373–379

О фотографии в начале главы

Данная глава началась с вопроса: «Это действительно глаз и мозг в чашке Петри?» Трехмерная структура из стволовых клеток в чашке является замечательным примером потенциала стволовых клеток для изучения развития и болезней. Да, это изображение пигментированного эпителия сетчатки, растущего над нервным эпителием церебрального органоида, подобного мозгу. Хотя данные органоиды, безусловно, обеспечивают новую платформу для изучения органогенеза человека и связанных с ним заболеваний, его исследование необходимо проводить объективно, чтобы понять ограничения, присущие этой системе. Что в настоящее время отсутствует внутри церебрального органоида? Это следующие структуры: кровеносные сосуды, канал со спинномозговой жидкостью и гипофиз. Будь то мозг, почки или органы пищеварительной системы, они еще не полноценны. Возможно, в будущем именно в вашем эксперименте будет создан первый полностью функциональный орган из стволовых клеток в чашке.

5

Коротко Стволовые клетки

1. Стволовая клетка сохраняет способность к делению, чтобы иметь возможность произвести копию самой себя, а также производить клетки-предшественники, способные созреть в различные типы клеток.
2. Потенциал стволовой клетки — это диапазон типов клеток, которые она может дать. Тотипотентная стволовая клетка может генерировать все типы клеток как эмбриональных, так и экстраэмбриональных линий. Плюрипотентные и мультипотентные стволовые клетки способны производить только эмбриональные клеточные линии или клетки определенных тканей или органов соответственно.
3. Взрослые стволовые клетки находятся в микроокружении, называемом нишей стволовых клеток. Большинство органов и тканей имеют стволовые клеточные ниши, такие как зародышевые клетки, кроветворные, кишечные и вентрикулярно-субвентрикулярные ниши.
4. В нише задействованы различные механизмы межклеточной коммуникации для регуляции состояния покоя, пролиферации и дифференцировки резидентных стволовых клеток.
5. Апикальные меристемы побега и корня обеспечивают постоянный источник тотипотентных стволовых клеток для создания большинства подземных и наземных тканей растения в течение всей жизни.
6. Механизмы отрицательной обратной связи регулируют способность устанавливать баланс между пулом стволовых клеток и дифференцировкой в апикальной меристеме побега.
7. Клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцисты мыши поддерживаются в плюрипотентном состоянии посредством взаимодействия Е-кадгерина с клетками трофобластической оболочки.
8. Кадгерин связывает зародышевые стволовые клетки яйцеклетки *Drosophila* с нишей, удерживая их в пределах полей TGF β . Асимметричные деления выталкивают дочерние клетки из этой ниши, что способствует клеточной дифференцировке половых клеток.
9. Вентрикулярно-субвентрикулярная зона (В-СВЗ) головного мозга представляет собой структурно сложную нишу. Стволовые клетки типа В расположены в виде розетки, с первичной ресничкой на апикальной поверхности и длинными радиальными отростками, которые заканчиваются базальной ножкой.
10. Постоянная активность Notch в нише В-СВЗ удерживает В-клетки в состоянии покоя, тогда как возрастающие колебания активности Notch по сравнению с экспрессией пронеуронных генов прогрессивно способствуют созреванию В-клеток в амплифицирующие С-клетки, а затем в мигрирующие нейронные предшественники (клетки типа А).
11. Дополнительные сигналы — от нервной системы и таких веществ, как GDF11, поступающего из крови, до градиентов Shh, BMP4 и Noggin — влияют на пролиферацию и дифференцировку В-клеток в нише В-СВЗ.
12. Столбчатые клетки, расположенные в основании кишечной крипты, служат стволовыми клетками для кишечного эпителия, который генерирует амплифицирующие эпителиальные клетки, медленно дифференцирующиеся по мере продвижения вверх по ворсинке.

13. Адгезия к остеобластам удерживает гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) в состоянии покоя в эндостальной нише. Повышенная экспрессия сигналов CXCL12 от клеток CAR и мезенхимных стволовых клеток может привести к переходу ГСК в пролиферативное состояние, однако снижение регуляции CXCL12 в периваскулярной нише стимулирует миграцию активных ГСК в богатые кислородом кровеносные сосуды.
14. Мезенхимальные стволовые клетки можно найти в различных тканях, включая соединительную ткань, мышцы, роговицу, пульпу зубов, кости и многое другое. Они играют двойную роль: поддерживают стромальные клетки и мультипотентные стволовые клетки.
15. Эмбриональные и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) могут сохраняться в культуре неограниченно долго и под воздействием определенных комбинаций факторов и/или физическом ограничении субстрата, могут быть направлены по пути дифференцировки в потенциально любой тип клеток организма.
16. Эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки используются для изучения развития и заболеваний человека. Использование стволовых клеток для изучения специфичной для пациента клеточной дифференцировки редких заболеваний крови, например анемия Фанкони, или расстройств нервной системы, например аутизм и БАС, уже позволило понять некоторые механизмы заболевания.
17. Плюрипотентные стволовые клетки могут быть использованы в регенеративной медицине для восстановления тканей и создания структур, называемых органоидами, которые, по-видимому, обладают структурой человеческих органов. Органоиды используют для изучения *in vitro* органогенеза человека и специфичного для пациента прогрессирования заболеваний на тканевом уровне.

Определение пола и гаметогенез

Как этот красный кардинал мог стать наполовину самцом (красный) и наполовину самкой (светло-коричневый)?



С разрешения: Brian D. Peer

Определение пола

«Половое размножение — чудо природы», — писал Эразм Дарвин в 1791 г., и современные исследования это только подтверждают. Различные виды живых организмов производят потомков мужского и женского пола различными путями. У млекопитающих и мух пол развивающегося организма определяется во время оплодотворения и зависит от набора хромосом, который формируется при слиянии **гамет** — сперматозоида и яйцеклетки. Однако существуют и другие способы определения пола. У некоторых видов животных и у многих растений организм может обладать чертами обоих полов — мужского и женского, т. е. быть гермафродитом, и, соответственно, производить как сперматозоиды, так и яйцеклетки. Более того, существуют животные, у которых пол обусловлен не набором хромосом, а условиями окружающей среды.

Гаметы — потомки **первичных половых клеток** (ППК), клеток **половой линии**, которые отделяются от клеток соматической линии, делящихся путем митоза и дающих начало дифференцированным соматическим клеткам эмбриона. Клетки половой линии претерпевают **мейотические деления** — важный процесс, при котором происходит уменьшение числа хромосом в клетке вдвое. Во время оплодотворения при слиянии гамет за счет комплементарного взаимодействия происходит восстановление числа хромосом в образующемся организме. Половое размножение означает, что каждый новый организм получает генетический материал от двух родительских организмов, а особенности протекания мейоза обеспечивают большое разнообразие генетических вариантов, благодаря чему может идти эволюционный процесс.

Хромосомное определение пола

Существует несколько вариантов генетического определения пола у эмбрионов животных. У большинства *млекопитающих* наличие второй X-хромосомы или Y-хромосомы определяет пол эмбриона — женский (XX) или мужской (XY). У *птиц* обратная картина (Smith and Sinclair, 2001): у самцов содержатся две одинаковых половых хромосомы (ZZ), а у самок — разные (ZW). У *мух* Y-хромосома не принимает участие в определении пола, в то время как число X-хромосом определяет половую принадлежность. У других насекомых (особенно у пчел, ос и муравьев — представителей перепончатокрылых) из оплодотворенного диплоидного яйца развивается самка, а из неоплодотворенного гаплоидного яйца — самцы (Beukeboom, 1995; Gempel et al., 2009; Ronai, 2016). В этой главе будут описаны только два варианта хромосомного определения пола у животных: определение пола у плацентарных млекопитающих и у плодовых мух (*Drosophila*).

Способы определения пола у млекопитающих

У людей и мышей наличие Y-хромосомы — ключевой фактор определения пола. Так, млекопитающие женского пола, обладающие яичниками, в которых созревают яйцеклетки, имеют две X-хромосомы, а млекопитающие мужского пола, обладающие семенниками и производящие сперматозоиды, имеют одну X- и одну Y-хромосому. В результате делений мейоза, имеющих место во время оо- и сперматогенеза, в женском организме формируются ооциты, несущие X-хромосомы, а в мужском — сперматозоиды, половина из которых несет X-хромосому, а вторая половина — Y-хромосому. Если сперматозоид, несущий X-хромосому, оплодотворит яйцеклетку, то развивающийся организм будет генетически самкой (XX). Если же сперматозоид несет Y-хромосому, то в результате оплодотворения получится организм мужского пола (XY) (рис. 6.1А; Stevens, 1905; Wilson, 1905 цит. по Gilbert, 1978). Эти процессы лежат в основе поддержания равного соотношения полов 50 : 50.

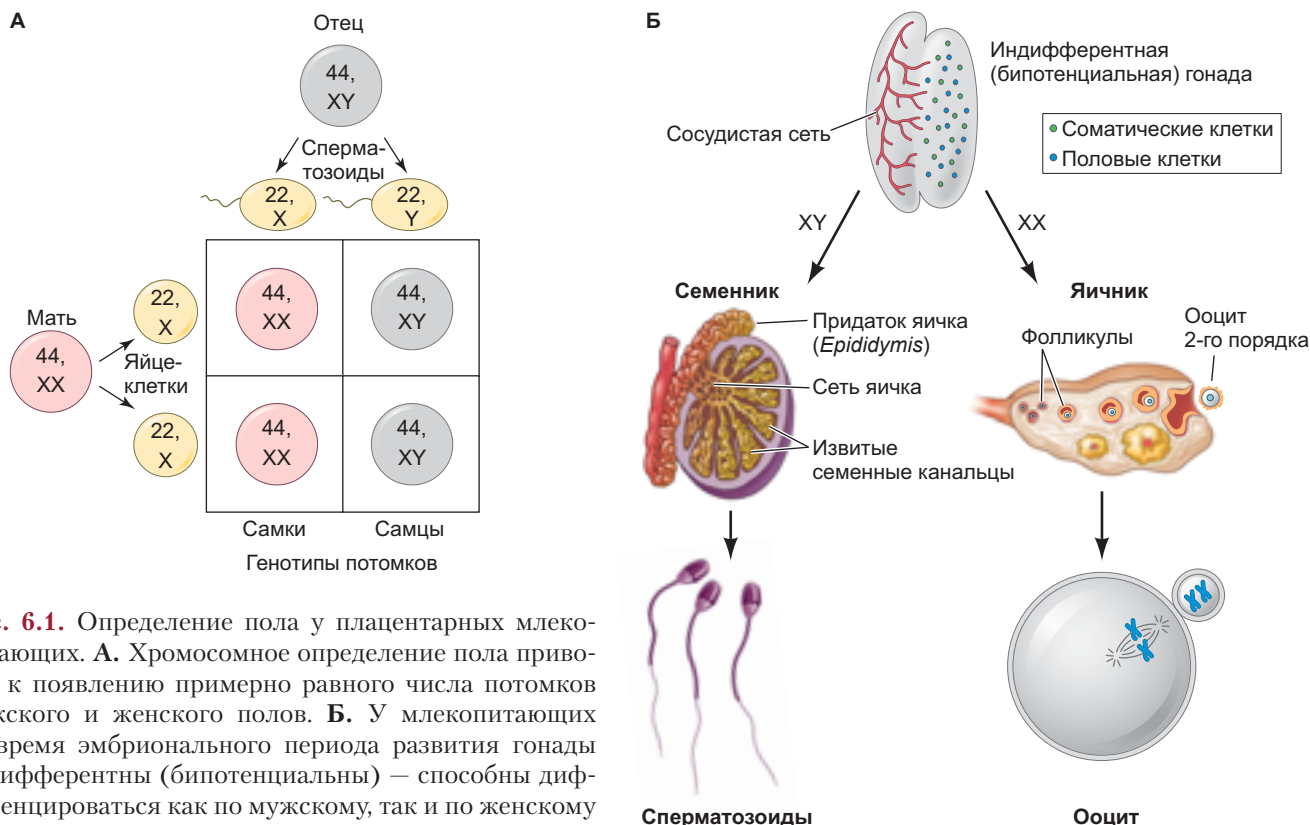


Рис. 6.1. Определение пола у плацентарных млекопитающих. **А.** Хромосомное определение пола приводит к появлению примерно равного числа потомков мужского и женского полов. **Б.** У млекопитающих во время эмбрионального периода развития гонады индифферентны (бипотенциальны) — способны дифференцироваться как по мужскому, так и по женскому типу. Если клетки содержат как X-, так и Y-хромосому, то гонады дифференцируются в семенники, где формируются сперматозоиды и синтезируются гормоны, обеспечивающие развитие мужского фенотипа. Если же клетки несут только X-хромосомы, гонады дифференцируются в яичники, где созревают яйцеклетки и синтезируются гормоны, отвечающие за проявление женских признаков

Однако они не дают исчерпывающего ответа на вопрос об определении пола у млекопитающих. Биологи развития пытаются установить, как носительство Y-хромосомы обеспечивает дифференцировку бипотенциальной гонады в семенник и последующую продукцию сперматозоидов, а также понять, как носительство двух X-хромосом обеспечивает дифференцировку индифферентной гонады в сторону яичника с последующим образованием ооцитов. Исключительное значение Y-хромосомы для определения пола по мужскому типу у млекопитающих было показано при исследовании людей, чей набор половых хромосом отличался от стандартного XX и XY. Когда во время мейоза не происходит правильное расхождение хромосом, во время оплодотворения может получиться организм с дополнительной X-хромосомой. Люди с кариотипом XXY имеют мужской пол, несмотря на наличие двух X-хромосом. Кроме того, организмы, несущие всего одну X-хромосому (X0), женского пола (Ford et al., 1959; Jacobs and Strong 1959). У особей женского пола, обладающих только одной X-хромосомой, происходит формирование яичников, однако формирование овариальных фолликулов в отсутствие второй X-хромосомы не происходит. Таким образом, наличие второй хромосомы является необходимым фактором для полноценного развития яичников, в то время как наличие Y-хромосомы (даже в присутствии нескольких X-хромосом) инициирует развитие семенников.

На что же конкретно влияют X- и Y-хромосомы? Известно, что на ранних этапах эмбрионального развития у мышей и у людей **гонады индифферентны** (бипотенциальны), т. е. способны развиваться как в семенники, так и в яичники (рис. 6.1Б). В клетках гонады с кариотипом XX происходит активация сигнального каскада Wnt. В свою очередь, она приводит к активации транскрипционного фактора β -катенина, который ингибирует дифференцировку клеток гонады в сторону клеток семенника и активирует экспрессию генов, обеспечивающих превращение клеток гонады в фолликулярные клетки яичника.

В клетках гонады с кариотипом XY происходит активация гена, кодирующего транскрипционный фактор Sry. Ген *Sry*, отвечающий за дифференцировку гонады по мужскому типу, расположен на коротком плече Y-хромосомы. Он активен в клетках в течение короткого промежутка времени. Вероятно, его единственная функция — запуск транскрипции гена *Sox9* в клетках гонады. Белок, продукт активности гена *Sox9*, является транскрипционным фактором, запускающим реакции, в результате которых индифферентные гонады развиваются в семенники. В семенниках образуются две популяции соматических клеток: клетки Сертоли, поддерживающие клетки сперматогенного ряда, и клетки Лейдига, синтезирующие тестостерон. Кроме того, Sox9 подавляет Wnt-путь, предотвращая дифференцировку клеток гонады по женскому типу и формирование яичников. Такое определение пути развития гонады по мужскому или

женскому типу называют первичным (или гонадным) определением пола, и оно осуществляется благодаря половым хромосомам X и Y, контролирующим путь развития исходно индифферентных (бипотенциальных) клеток формирующейся половой железы.

Как только произошло гонадное определение пола, половые железы начинают синтезировать гормоны и паракринные факторы, управляющие вторичным определением пола — развитием внешних половых признаков (фенотипа). К таким признакам относят формирование мужских и женских протоков и наружных половых органов (рис. 6.2), что будет детально описано ниже.

Гонадное определение пола у млекопитающих

Индифферентная (бипотенциальная) гонада эмбриона млекопитающих — уникальный орган. Зачатки всех остальных органов могут дифференцироваться только в одном направлении (например, зачаток легкого может стать только легким, а зачаток печени — печенью). Однако зачаток гонады может развиваться как в семенник, так и в яичник — в два органа с существенно различающейся архитектурой ткани (Lillie, 1917; Rey et al., 2016).

РАЗВИВАЮЩИЕСЯ ГОНАДЫ

В эмбрионах человека два зачатка половых желез появляются на 4-й неделе развития и остаются индифферентными до 7-й недели. Эти два предшественника гонад — мезодермальные образования, прилегающие к развивающимся почкам (рис. 6.3А, Б; Tanaka and Nishinakamura, 2014). Первичные **половые клетки** — предшественники как сперматозоидов, так и яйцеклеток — мигрируют в гонаду во время 6-й недели эмбрионального развития и оказываются окруженными клетками мезодермального происхождения.

Если плод имеет кариотип XY, мезодермальные клетки продолжают пролиферировать вплоть до 8-й недели внутриутробного развития, когда большая часть данных клеток уже вступает на путь дифференцировки в сторону **клеток Сертоли**. В эмбриональном периоде клетки Сертоли секретируют **антимюллеров гормон** (АМГ), который ингибирует развитие протоков женской половой системы. Это те же эпителиальные клетки Сертоли, которые формируют стенку семенного канальца и поддерживают развитие сперматозоидов на протяжении всей жизни самца млекопитающих.

В течение 8-й недели развивающиеся клетки Сертоли окружают мигрировавшие половые клетки и самоорганизуются в **половые тяжи яичка**. Половые тяжи формируют петли в центральной области развивающегося семенника и соединяются с сетью тон-

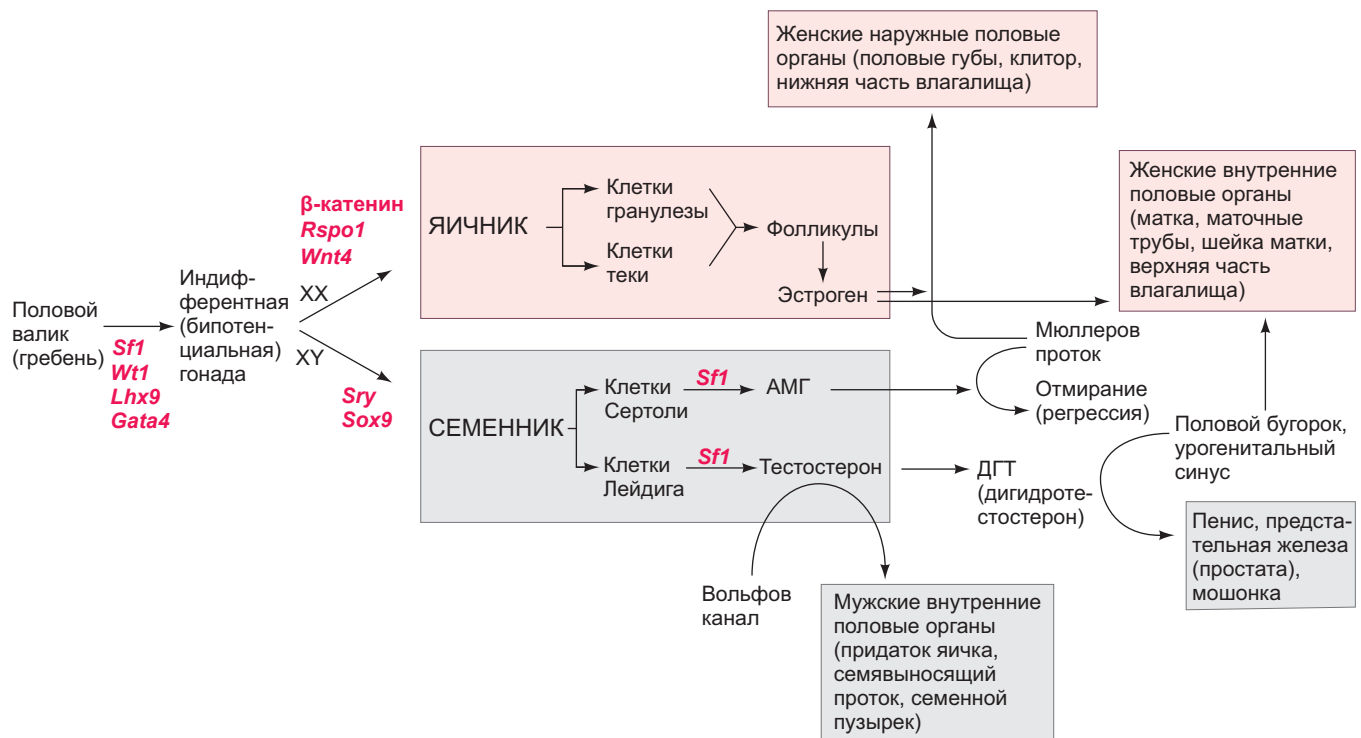


Рис. 6.2. Предполагаемые последовательности событий, отвечающие за развитие мужских и женских фенотипических признаков у плацентарных млекопитающих. Для развития половых валиков в индифферентную (бипотенциальную) гонаду необходима активность генов *Sf1*, *Wt1*, *Lhx9* и *Gata4*. У мышей с нарушенной работой любого из данных генов не формируются гонады. Гены *Wnt4* и *Rspo1* способствуют накоплению β -катенина, что направляет бипотенциальную гонаду на путь дифференцировки по женскому типу (развитие яичника). В противном случае индифферентная гонада дифференцируется по мужскому пути (формирование семенников) благодаря активности расположенного на Y-хромосоме гена *Sry*, регулирующего активность *Sox9*. Под действием эстрогена (сначала поступающего из организма матери, а впоследствии синтезируемого яичниками плода) мюллеровы протоки дифференцируются в органы женского полового тракта, развиваются внутренние и наружные половые органы, идет развитие вторичных половых признаков, характерных для женского организма. В семенниках синтезируется антимюллеров гормон (АМГ), вызывающий регрессию мюллеровых протоков, и тестостерон, способствующий дифференцировке вольфовых протоков в мужские внутренние половые органы. В урогенитальном синусе тестостерон превращается в дигидротестостерон (ДГТ), необходимый для формирования пениса, предстательной железы и мошонки. (По данным: J. Marx, 1995. *Science* 269: 1824–1825 и O. S. Birk et al., 2000. *Nature* 403: 909–913)

ких каналов, называемой *rete testis*, расположенной около развивающихся протоков почки (рис. 6.3В, Г). Таким образом, когда половые клетки заселяют мужскую гонаду, они развиваются в составе половых шнуров *внутри* органа. Половые клетки проходят несколько раундов митотических делений, а затем происходит остановка митоза. На более поздних стадиях развития (у человека — при наступлении полового созревания, у мышей, размножающихся намного быстрее, — вскоре после рождения) половые тяжи развиваются в **семенные каналцы**. Половые клетки перемещаются на периферию каналцев, где формируют популяцию **сперматогониальных стволовых клеток**, которые будут обеспечивать производство сперматозоидов на протяжении всей жизни самца (см. рис. 6.21).

Тем временем другая большая группа мезодермальных клеток (те, которые не дифференцируются в клетки Сертоли) дифференцируются в клетки мезенхимного фенотипа — секретирующие тестостерон **клетки Лейдига**. Таким образом, сформированный семенник состоит из эпителиальных каналцев, образованных клетками Сертоли, поддерживающими половые клетки, и популяции мезенхимных клеток (клеток Лейдига), синтезирующих **тестостерон**. Каждое яичко окружено тонким слоем внеклеточного матрикса — белочной оболочкой *tunica albuginea*, выполняющей защитную функцию.

Если плод имеет кариотип XX, половые клетки заселяют гонаду и организуются в кластеры (цисты), окруженные **предшественниками клеток гранулезы**. Во время этого эмбрионального периода раз-

вития женские половые клетки вступают в мейоз. Незадолго до рождения предшественники клеток гранулезы дегенерируют в центральной зоне гонады и остаются только в ее поверхностном слое (кортексе). Каждая половая клетка окружена отдельным небольшим кластером предшественников клеток гранулезы (рис. 6.3Д, Е). Половые клетки станут развивающимися яйцеклетками, **ооцитами**. Клетки, окружающие ооциты, дифференцируются в **клетки гранулезы**. Большая часть оставшихся мезенхимных клеток дифференцируется в **клетки теки**. Совместно

клетки теки и гранулезы образуют фолликулы, в составе которых развиваются ооциты, а также идет синтез стероидных гормонов, таких как эстрогены и прогестерон (во время беременности). Между половыми и соматическими клетками гонады существуют реципрокные отношения. Исходно половые клетки бипотенциальны и способны дифференцироваться как в сперматозоиды, так и в яйцеклетки. Однако после попадания в мужской или женской половой шнур они вступают на один из двух путей развития: 1) приступают к мейозу и превращаются в яйцеклет-

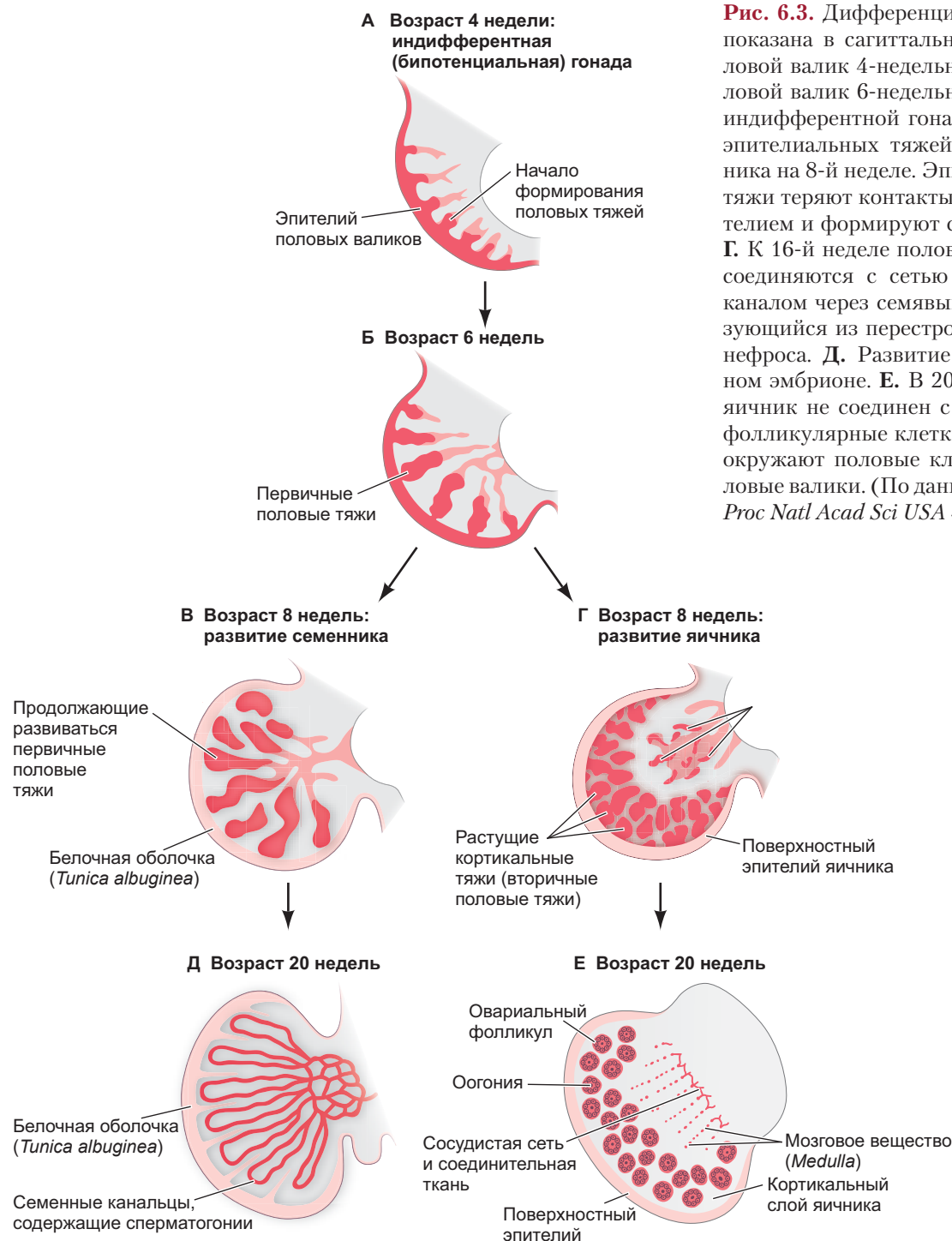


Рис. 6.3. Дифференцировка гонад человека показана в сагиттальной проекции. **А.** Половой валик 4-недельного эмбриона. **Б.** Половой валик 6-недельного эмбриона, стадия индифферентной гонады, начало вrastания эпителиальных тяжей. **В.** Развитие семенника на 8-й неделе. Эпителиальные половые тяжи теряют контакты с кортикальным эпителием и формируют сеть яичка (*rete testis*). **Г.** К 16-й неделе половые шнуры семенника соединяются с сетью яичка и вольфовым каналом через семявыносящий канал, образующийся из перестроенного протока мезонефроса. **Д.** Развитие яичника в 8-недельном эмбрионе. **Е.** В 20-недельном эмбрионе яичник не соединен с вольфовым каналом, фолликулярные клетки кортикального слоя окружают половые клетки, заселившие половые валики. (По данным: R. K. Burns, 1955. *Proc Natl Acad Sci USA* 41: 669–676.)

ки либо 2) останавливают митотические деления и превращаются в сперматогонии, сперматогониальные стволовые клетки (McLaren, 1995; Brennan and Capel, 2004). В гонадах с кариотипом XX половые клетки необходимы для поддержания овариальных фолликулов. В отсутствие половых клеток фолликулы дегенерируют. В гонадах с кариотипом XY половые клетки поддерживают дифференцировку клеток Сертоли, но не являются необходимыми для поддержания структуры семенника (McLaren, 1991).

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ГОНАДНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА: ПРИНЯТИЕ РЕШЕНИЙ

Было выявлено несколько генов человека, активность которых необходима для определения пола. Так как фенотипическим проявлением мутаций

в генах, отвечающих за определение пола, является стерильность, клинические исследования бесплодия были чрезвычайно полезны при выявлении генов, транскрипционно активных при определении пола эмбриона. Эксперименты по подтверждению функции этих генов могут быть проведены на лабораторных мышах.

Процесс начинается еще в индифферентной гонаде, которая в этот момент не дифференцирована ни по женскому, ни по мужскому типу. В гонадах начинают экспрессироваться гены, кодирующие транскрипционные факторы Wt1, Lhx9, Gata4 и Sf1. В случае потери функции хотя бы одним из этих белков происходит нарушение нормального развития как женских, так и мужских половых желез. Далее следует ряд событий, приводящий к определению направления дифференцировки гонады. На **рис. 6.4** представлен один из возможных вариантов активации

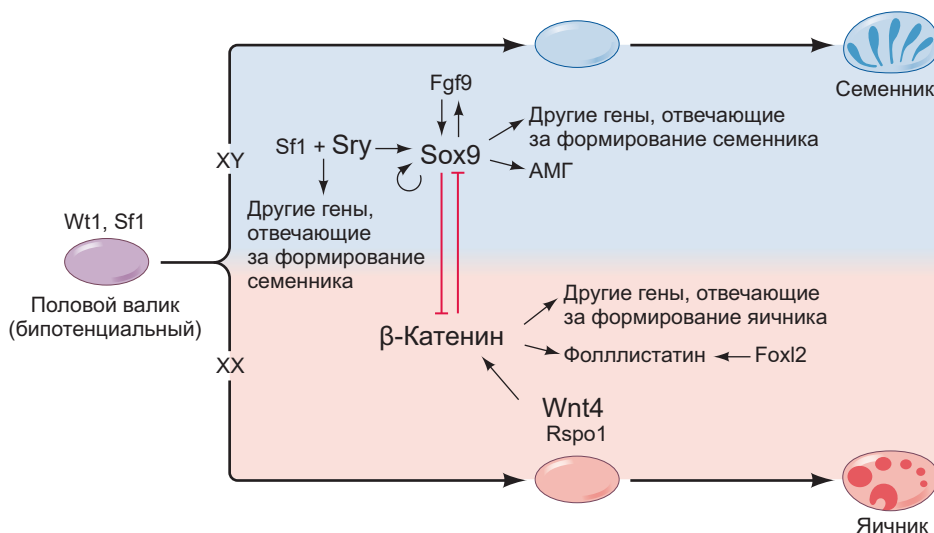


Рис. 6.4. Возможный механизм начальных этапов гонадного определения пола у млекопитающих. Несмотря на то что конкретные взаимодействия еще не известны, в данной схеме сделана попытка организации имеющихся данных в единую цепь событий. В *отсутствие* Sry (показано *розовым*) взаимодействие между транскрипционными факторами в развивающемся половом валике активирует Wnt4 и Rspo1. Wnt4 активирует канонический сигнальный путь Wnt, эффективность которого повышается благодаря Rspo1. Активация канонического сигнального пути Wnt приводит к накоплению β-катенина, что в свою очередь приводит к стимулированию дальнейшей активации Wnt4. Такая непрерывная продукция β-катенина одновременно активирует транскрипцию генов, отвечающих за развитие яичников, и ингибирует путь развития семенников путем блокирования Sox9. В *присутствии* Sry (показано *голубым*) происходит ингибирование сигнального пути, связанного с β-катенином (таким образом останавливается развитие яичника), и совместно с Sf1 происходит активация гена Sox9. Sox9 активирует синтез Fgf9, который поддерживает развитие семенника, ингибирует Wnt4 и обеспечивает дальнейший синтез Sox9. Sox9 также предотвращает активацию генов, связанных с развитием яичников, вызываемую β-катенином. Sry может активировать и другие гены, способствующие образованию клеток Сертоли. Таким образом, петля Wnt4/β-катенин отвечает за развитие яичников, а петля Sox9/Fgf9 — за развитие семенников. Одной из мишеней сигнального пути Wnt является ген *Follistatin* (*фоллистатин*), кодирующий белок, необходимый для правильной организации клеток гранулы яичника. Транскрипционный фактор Foxl2, активированный в яичнике, тоже участвует в индукции синтеза фоллистатина. По-видимому, путь XY запускается раньше, и если он не работает, то активируется путь XX. (По данным: R. Sekido and R. Lovell-Badge, 2009. *Trends Genet* 25: 19–29; K. McClelland et al., 2012. *Asian J Androl* 14: 164–171.)

ции дифференцировки в одном из направлений. Данный пример служит хорошей иллюстрацией важного правила, общего для развития животных: путь, направляющий дифференцировку клеток, как правило, содержит две альтернативных ветви, одна из которых говорит: «делай А», а вторая: «...и не делай Б». При дифференцировке гонад по мужскому типу сигналы говорят: «делай семенники и не делай яичники», в то время как при дифференцировке по женскому типу: «делай яичники и не делай семенники».

ПУТЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЯИЧНИКОВ: ЗНАЧЕНИЕ β -КАТЕНИНА

Если Y-хромосома отсутствует, транскрипционные факторы Wt1, Lhx9, Gata4 и Sf1 активируют дальнейшую экспрессию белка Wnt4 (который уже имеет фоновую экспрессию в эпителии гонады) и растворимого белка **R-спондина-1** (Rspo1), молекула которого имеет небольшой размер. Rspo1 действует совместно с Wnt4, усиливая его влияние на синтез β -катенина, необходимого как для дальнейшего развития яичников, так и для ингибирования синтеза транскрипционного фактора Sox9, важного для развития семенников (Maatouk et al., 2008; Jameson et al., 2012). У людей с кариотипом XX, рожденных с мутациями в гене *RSPO1*, проявляются фенотипические признаки мужского пола (Parma et al., 2006; Harris et al., 2018). У лиц с кариотипом XY и дупликацией той области первой хромосомы, которая содержит гены *WNT4* и *RSPO1*, сигнальный путь β -катенина перекрывает путь дифференцировки по мужскому типу, что приводит к инверсии пола — переключению с мужского пола на женский. Аналогичные результаты показали эксперименты на мышах. Если у самцов мышей в зачатках гонад вызвать избыточную экспрессию β -катенина, то будут формироваться яичники, а не семенники. По-видимому, для всех групп позвоночных животных β -катенин является ключевой «прояичниковой/антисеменниковой» сигнальной молекулой. Это справедливо для женских (но не мужских) гонад птиц, млекопитающих и черепах, относящихся к трем группам животных с существенно различающимся способом определения пола (Maatouk et al., 2008; Cool and Capel, 2009; Smith et al., 2009).

ПУТЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СЕМЕННИКОВ: SRY И SOX9

Если Y-хромосома присутствует, то все тот же набор факторов (Wt1, Lhx9, Gata4 и Sf1) в индифферентной гонаде активирует ген *Sry* (sex-determining region of the Y chromosome — область Y-хромосомы, отвечающая за определение пола) (Carré et al., 2018; Kuroki and Tachibana, 2018). Существует множество доказательств того, что ген *SRY* кодирует фактор,

определяющий дифференцировку семенников. У людей *SRY* обычно имеется у мужчин с кариотипом XY, но встречается и у мужчин с редким кариотипом XX; он отсутствует у женщин с кариотипом XX, а также у многих женщин с кариотипом XY. В человеческой популяции приблизительно 15% женщин с кариотипом XY являются носителями гена *Sry*, однако в данном гене у них точечные мутации или мутации, связанные со сдвигом рамки считывания, препятствуют связыванию белка *SRY* с ДНК (Pontiggia et al., 1994; Werner et al., 1995). Самые впечатляющие доказательства того, что ген *Sry* кодирует фактор, отвечающий за дифференцировку семенников, были получены в экспериментах на трансгенных мышах. Если *Sry* действительно вызывает развитие семенников, то его вставка в геном нормальной зиготы мыши с кариотипом XX должна привести к развитию у этой мыши семенников, а не яичников. Коопман и его соавторы (1991) взяли последовательность ДНК длиной 14 килобаз, содержащую ген *Sry* (и, предположительно, его регуляторные элементы), и провели ее микроинъекцию в пронуклеусы недавно оплодотворенных яйцеклеток (зигот) мыши. В нескольких случаях после инъекции у эмбрионов с кариотипом XX развивались семенники, мужские вспомогательные органы и пенис (рис. 6.5)¹. Таким образом, мы делаем вывод, что *Sry/SRY* — единственный геном на Y-хромосоме, необходимый для развития семенников у млекопитающих.

Несмотря на безусловную значимость для определения пола по мужскому типу, ген *Sry* у мышей во время развития гонад активен, вероятно, на протяжении всего нескольких часов. В это время происходит синтез транскрипционного фактора *Sry*, основная роль которого, по-видимому, заключается в активации аутосомного гена *Sox9* (Sekido and Lovell-Badge, 2008). Он вызывает развитие семенников из зачатков гонады. Люди и мыши с кариотипом XX, у которых имеется дополнительная активированная копия *SOX9/Sox9*, развиваются как самцы, даже если у них нет гена *SRY/Sry* (рис. 6.6A–B; Huang et al., 1999; Qin and Bishop, 2005). Нокаут (выключение) гена *Sox9* в гонадах мышей с кариотипом XY приводит к полной инверсии пола (Barrionuevo et al., 2006). Действительно, если удалить у эмбриона мыши с кариотипом XY энхансер *Sox9*, который связывается с белком *Sry*, то у эмбриона развиваются яичники (Gonen et al., 2018).

Sox9, по-видимому, является наиболее старым и консервативным геном, отвечающим за определение пола у позвоночных (Pask and Graves, 1999). Ген *Sry*

¹ У этих эмбрионов не формируются функциональные сперматозоиды, что было ожидаемо. Наличие двух X-хромосом предотвращает образование спермы у мышей и мужчин с генотипом XXY, а у трансгенных мышей отсутствует часть Y-хромосомы, которая содержит гены, необходимые для нормального протекания сперматогенеза.

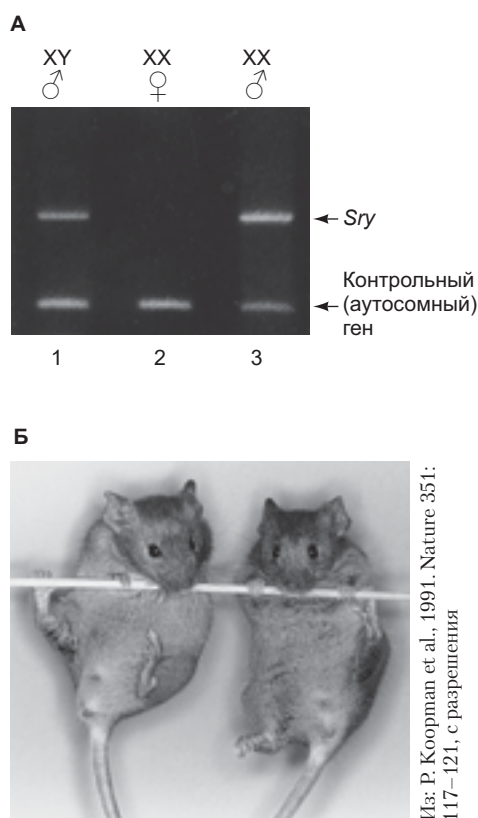


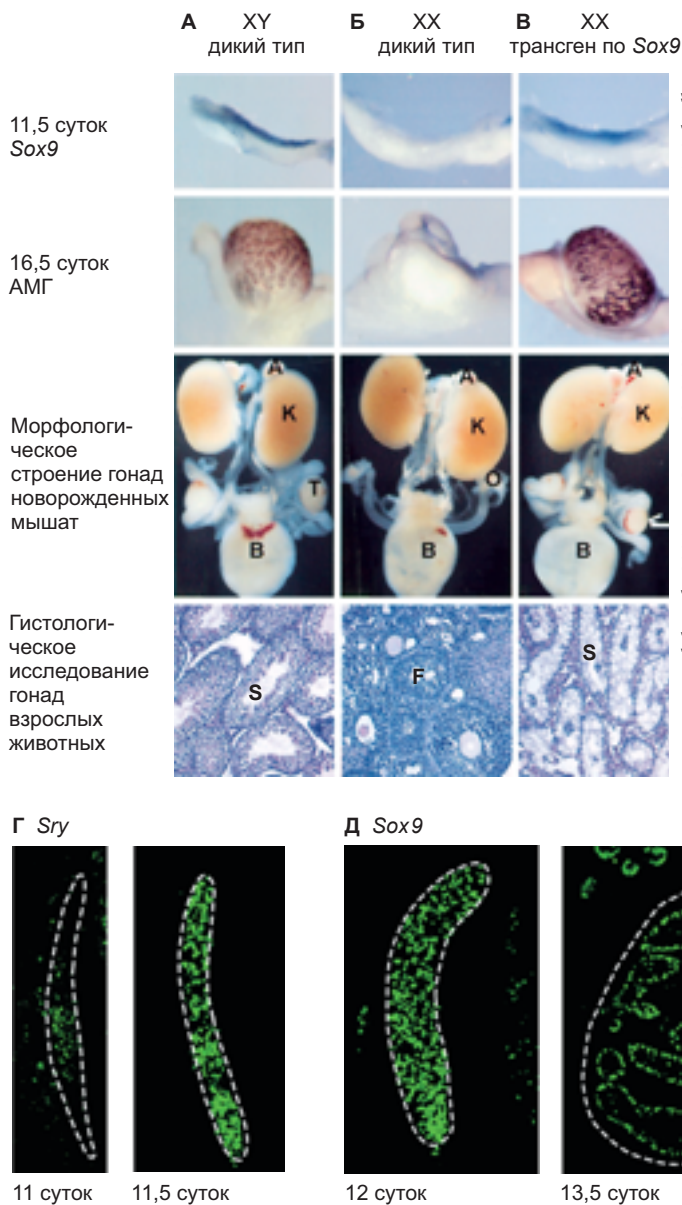
Рис. 6.5. Мышь с кариотипом XX, трансгенная по *Sry*, является самцом. **А.** Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с последующим электрофорезом продукта показывает наличие гена *Sry* как в тканях контрольного XY-животного, так и в трансгенной XX/*Sry*-мышь. Ген отсутствует у самок XX из того же помета. **Б.** Наружные половые органы у трансгенных мышей XX/*Sry* — мужские (справа) и по существу такие же, как у самца XY (слева)

обнаружен именно у млекопитающих, в то время как *Sox9* — у всех типов позвоночных. У млекопитающих *Sox9* активируется посредством белка Sry, у птиц, лягушек и рыб его активация происходит в зависимости от количества транскрипционного фактора Dmrt1, т. е. дозозависимо; у позвоночных, у которых определение пола зависит от температуры, активация данного гена (прямо или косвенно) связана с температурой, при которой развиваются самцы. У млекопитающих уровень экспрессии гена *Sox9* специфически повышается за счет комбинированной экспрессии белков Sry и Sf1 в предшественниках клеток Сертоли (рис. 6.6. Г, Д; Sekido et al., 2004; Sekido and Lovell-Badge, 2008). Таким образом, Sry может действовать просто как «переключатель», работающий в течение очень короткого времени, для активации *Sox9*, а белок Sox9 может инициировать консервативный эволюционный путь дифференцировки семенника. Перефразируя Е. Idle, Sekido и Lovell-Badge (2009) предлагают такую формулировку: Sry инициирует формирование семенника «подмигиванием и толчком».

Белок Sox9 выполняет несколько функций. Во-первых, он, вероятно, способен активировать свой собственный промотор, что позволяет ему транскрибироваться в течение длительного времени (независимо от Sry). Во-вторых, он прямо или косвенно блокирует способность β -катенина индуцировать формирование яичников (Wilhelm et al., 2009). В-третьих, связывается с *цис*-регуляторными областями многочисленных генов, необходимых для дифференцировки семенника (Bradford et al., 2009a; Rahmoun et al., 2017). В этот перечень входят гены, кодирующие антимюллеров гормон (он вызывает деградацию мюллерова протока, из которого развивается матка; Arango et al., 1999; de Santa Barbara et al., 2000), Dmrt1 (необходимый для формирования семенника) и Fgf9, один из важнейших паракринных факторов, регулирующих развитие семенника. Fgf9 также важен для поддержания транскрипции гена *Sox9*, тем самым он создает петлю положительной обратной связи, направляющую дифференцировку по мужскому типу (Kim et al., 2007).

Гермафродиты — особи, в организме которых присутствуют ткани как яичника, так и семенника, а также может быть овотестис (половая железа с компонентами яичка и яичника) или яичник с одной стороны и семенник с другой¹. Эксперименты с активацией экспрессии гена *Sry* у мышей показали, что овотестисы могут образовываться, когда ген *Sry* активируется всего на несколько часов позже, чем обычно. Кроме того, задержка активации *Sry* всего на 5 ч приводит к сбою развития семенника и началу развития яичника. Гермафродиты могут появляться и в тех очень редких случаях, когда Y-хромосома транслоцируется на X-хромосому. Как мы обсудим позже в этой главе, одна из двух X-хромосом в каждой клетке с кариотипом XX инактивируется. (Данный механизм гарантирует, что продукты трансляции генов, находящихся на X-хромосоме, представлены не в двойном количестве по отношению к мужским генам). В клетках, где произошла транслокация на активированную X-хромосому, Y-хромосома активна, и ген *Sry* будет транскрибироваться; в тех клетках, где транслокация произошла на инактивированную X-хромосому, Y-хромосома также будет неактивна (Berkovitz et al., 1992; Margarit et al., 2000). Такой гонадный мозаицизм клеток, экспрессирующих *Sry*, может приводить к образованию семенника, яичника или овотестиса в зависимости от процента клеток, экспрессирующих *Sry*, в популяции предшественников клеток Сертоли (Brennan and Capel, 2004; Kashimada and Koopman, 2010).

¹ Этот анатомический фенотип назван по имени Гермафродита, молодого человека — героя греческой мифологии, чья красота разожгла пыл водяной нимфы Салмакиды. Она хотела быть с ним навсегда, и боги исполнили ее желание, в буквальном смысле этого слова. Гермафродитизм часто считается одним из «интерсекс-состояний», обсуждаемых далее в этой главе.



Из: V. P. I. Vidal et al., 2001. Nat Genet 28: 216–217, с разрешения A. Schedl

Из: K. Kashimada and P. Koopman, 2010. Development 137: 3921–3930, с разрешения

Рис. 6.6. Способность белка Sox9 регулировать формирование семенников. **А.** В зародыше мыши дикого типа с кариотипом XY начинается экспрессия гена *Sox9* в половом валике через 11,5 суток после оплодотворения, антимюллерова гормона — в клетках Сертоли эмбриональной гонады через 16,5 суток и в итоге образуются опускающиеся в мошонку яички с семенными канальцами. К — почки; А — надпочечники; В — мочевой пузырь; Т — семенник; О — яичник; S — семенные канальцы; F — фолликулярные клетки. **Б.** В клетках эмбриона дикого типа с кариотипом XX отсутствует экспрессия *Sox9* и *АМГ*. Формируются яичники со зрелыми фолликулярными клетками. **В.** Трансгенный по *Sox9* эмбрион с кариотипом XX экспрессирует *Sox9* и *АМГ* в клетках Сертоли на 16,5 сутки развития. У такого эмбриона яички опускаются в мошонку, но семенные канальцы лишены сперматозоидов (из-за отсутствия двух X-хромосом в клетках Сертоли). **Г, Д.** Хронология событий от экспрессии *Sry* в половом валике до экспрессии *Sox9* в клетках Сертоли. **Г.** Экспрессия гена *Sry*. На 11-е сутки развития белок *Sry* (зеленый) обнаруживают в центре полового валика. На 11,5 сутки развития уровень экспрессии *Sry* увеличивается, и активируется экспрессия *Sox9*. **Д.** Экспрессия гена *Sox9*. К 12-м суткам развития белок Sox9 (зеленый) выявляется в тех же клетках, которые ранее экспрессировали *Sry*. К 13,5 суткам развития Sox9 обнаруживают в тех клетках канальца семенника, которые станут клетками Сертоли

Вторичное определение пола у млекопитающих: гормональная регуляция полового фенотипа

Гонадное определение пола — формирование семенника или яичника из индифферентной гонады — не приводит к формированию фенотипа, соответствующего тому или иному полу. У млекопитающих вторичное определение пола — это развитие женских и мужских фенотипических признаков в ответ на действие гормонов, выделяемых яичниками и семенниками. Вторичное определение пола по женскому или мужскому типу происходит во время двух основных фаз развития. Первая фаза идет внутри эмбриона во время органогенеза, вторая — в период полового созревания.

Во время эмбрионального развития гормоны и паракринные факторы координируют развитие гонад с развитием вторичных половых признаков. Сеть

протоков репродуктивной системы берет начало от недифференцированных мюллеровых протоков (женский) и вольфовых каналов (мужской), которые присутствуют в зародыше (рис. 6.7). У женщин мюллеровы протоки сохраняются и благодаря воздействию эстрогена дифференцируются в матку, шейку матки, яйцеводы и верхнюю часть влагалища (Cunha and Baskin, 2018; Isaacson et al., 2018). Эти органы часто «бифункциональны» и играют важную роль как в доставке сперматозоидов к яичнику, так и в перемещении и удержании эмбриона:

- Верхняя часть влагалища (не та, которая связана с кожей) становится наружным входом в репродуктивную систему женщины. Он необходим как канал для поступления спермы и в качестве родового пути для ребенка.
- Шейка матки — внутренний вход в матку с хорошо развитым мышечным слоем, выделяет слизь, которая регулирует поступление сперматозоидов

в матку. Во время беременности она удерживает плод в матке до родов.

- Матка может активно способствовать движению сперматозоидов к яйцеводам. Во время беременности она обеспечивает питание, необходимое для роста и развития зародыша.

- Пара яйцеводов (фаллопиевы трубы у человека) обеспечивает капацитацию (окончательное созрева-

ние) сперматозоидов и направляет их к яйцеклетке. После оплодотворения яйцеводы участвуют в перемещении эмбриона в сторону матки.

У самок **половой бугорок** (предшественник наружных половых органов) дифференцируется в клитор, а **лабиоскротальные складки** (боковые складки с двух сторон от клоакальной мембраны эмбриона) превращаются в большие половые губы. Для со-

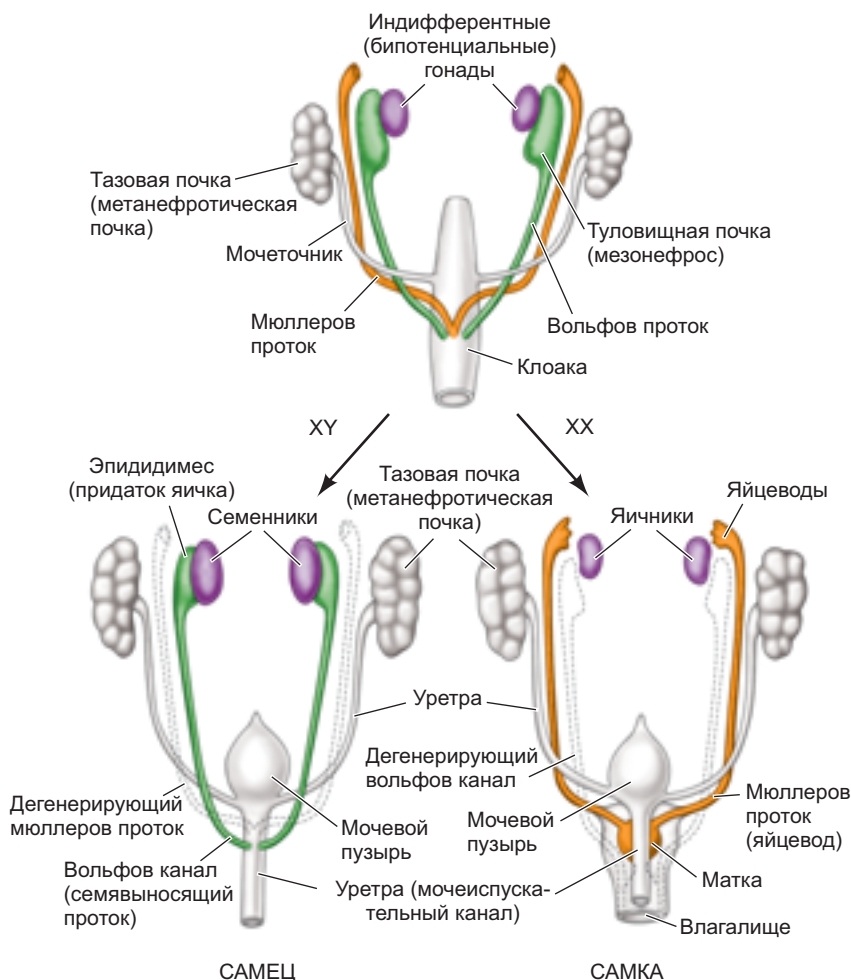


Рис. 6.7. Развитие гонад и их протоков у млекопитающих. Исходно развивается индифферентная (бипотенциальная) гонада с двумя наборами недифференцированных протоков: мюллеровы протоки (женские) и вольфовы протоки (мужские). Если организм с кариотипом XY, гонады становятся семенниками и сохраняются только вольфовы протоки. Если организм с кариотипом XX, гонады развиваются в яичники и сохраняются только мюллеровы протоки. Гормоны, выделяемые половыми железами, стимулируют развитие внешних половых органов как по мужскому типу (пенис, мошонка), так и по женскому (клитор, большие половые губы) (см. табл.)

ГОНАДЫ		
Тип гонады	Семенники	Яичники
Расположение половых клеток	Внутри половых шнуров семенника (в мозговом слое семенника)	Внутри фолликулов в кортикальном слое яичника
ПРОТОКИ		
Сохраняющиеся протоки	Вольфовы	Мюллеровы
Дифференцировка протока	Семявыносящий проток, семенной пузырек	Маточная трубка, матка, шейка матки, верхняя часть влагалища
УРОГЕНИТАЛЬНЫЙ СИНУС		
	Предстательная железа (простата)	Железы Сkene (парауретральные)
ЛАБИОСКРОТАЛЬНЫЕ СКЛАДКИ		
	Мошонка	Большие половые губы
ПОЛОВОЙ БУГОРОК		
	Пенис	Клитор

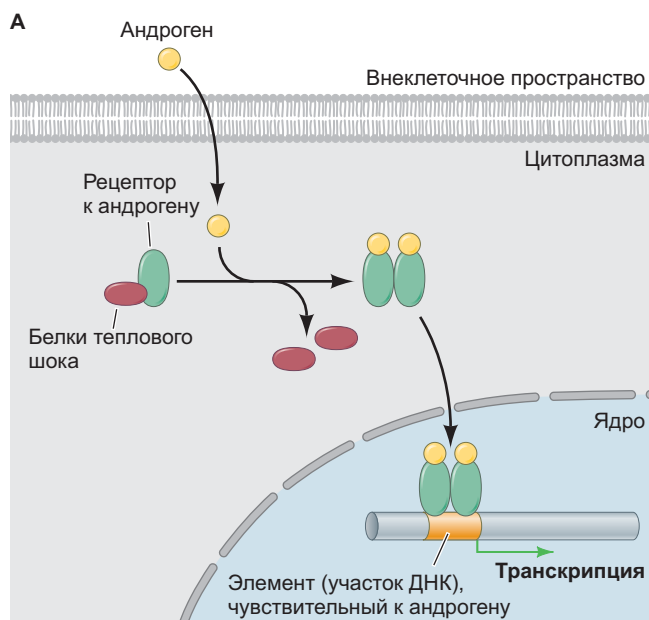
хранения вольфовых протоков необходим тестостерон, следовательно, у женщин они атрофируются. У женщин та часть **урогенитального синуса**, которая не становится мочевым пузырем и мочеиспускательным каналом, становится железами Сkene — парными органами, выделяющими секреты, аналогичные выделениям простаты (см. табл. на рис. 6.7).

Регуляция развития мужского фенотипа включает в себя секрецию двух факторов семенника. Первым из них является антимюллеров гормон (АМГ), ВМР-подобный паракринный фактор, вырабатываемый клетками Сертоли, который вызывает дегенерацию мюллеровых протоков. Вторым является стероидный гормон тестостерон, **андроген** (маскулинизирующее вещество), выделяемый клетками Лейдига плода. Считается, что тестостерон ингибирует сигнал гибели, направляемый соседними мезенхимными клетками к клеткам эпителия вольфовых протоков (Zhao et al., 2017). Кроме того, эти факторы направляют дифференцировку вольфовых протоков в каналы для переноса сперматозоидов (эпидидимис

и семявыносящий проток). Фетальный тестостерон также вызывает развитие пениса из полового бугорка, а лабиоскротальных (губчатых) складок — в мошонку. У мужчин уrogenитальный синус, помимо образования мочевого пузыря и уретры, принимает участие в образовании предстательной железы (см. табл. на рис. 6.7).

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВТОРИЧНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА ПО МУЖСКОМУ ТИПУ

Семенники инициируют два независимых пути маскулинизации у млекопитающих. Тестостерон, вырабатываемый клетками Лейдига в семенниках, способствует формированию мужского телосложения. Антимюллеров гормон, вырабатываемый клетками Сертоли, вызывает дегенерацию протока, из которого в противном случае сформировалось бы влагалище, шейка матки, матка и яйцеводы. Независимость этих двух путей показана в исследованиях с участием лю-



Б



С разрешения: Kimberly Saviano/AISSG-USA

Рис. 6.8. Синдром нечувствительности к андрогенам. **А.** Механизм передачи сигнала через рецептор андрогена. Тестостерон — андрогенный (маскулинизирующий) стероидный гормон, который с током крови может поступать в клетки. В цитоплазме он связывается со своим белковым рецептором (рецептором андрогена, иногда называемым рецептором тестостерона), вытесняя другие белки (такие как белки теплового шока). Это позволяет андрогенному рецептору димеризоваться (соединяться с другим рецептором) и проникать в ядро. Связанный тестостерон позволяет рецепторному белку функционировать как транскрипционному фактору — связываться с определенными генами, чтобы сформировался мужской фенотип. **Б.** Группа женщин с синдромом нечувствительности к андрогенам и другими нарушениями полового развития. Несмотря на кариотип XY, у людей с синдромом нечувствительности к андрогенам развиваются вторичные женские половые признаки. (По данным: P. Li et al., 2017. *Cancers* 9: 20/CC BY 4.0.)

дей с синдромом нечувствительности к андрогенам. Такие женщины имеют кариотип XY и, следовательно, имеют ген *SRY*. У них образуются семенники, которые вырабатывают тестостерон и АМГ. Однако для них характерна мутация в гене, кодирующем белок рецептора андрогена, который связывает тестостерон, а такое связывание необходимо, для того чтобы тестостерон мог работать как активный транскрипционный фактор (рис. 6.8А). Следовательно, эти люди не могут отвечать на тестостерон, вырабатываемый их семенниками (Meyer et al., 1975; Jääskelä, 2012), однако могут реагировать на эстроген, вырабатываемый их надпочечниками (что нормально для людей с кариотипом и XX, и XY), поэтому у них развиваются женские внешние половые признаки (см. рис. 6.8Б). Несмотря на явно женскую внешность, у этих лиц с кариотипом XY есть семенники; и хотя они не могут отвечать на тестостерон, они производят и отвечают на АМГ. Таким образом, их мюллеровы протоки дегенерируют. Люди с синдромом нечувствительности к андрогенам развиваются как нормальные, но бесплодные женщины с отсутствием матки и яйцеводов и семенниками, расположенными в брюшной полости.

Хотя у большинства людей существует точная корреляция между первичными и вторичными половыми признаками, около 0,5–1,7% населения отходит от строгого диморфного состояния (примерно такой же процент населения имеет врожденно рыжие волосы; Fausto-Sterling, 2000; Hull, 2003; Hughes et al., 2006). Фенотипы, при которых мужские и женские признаки можно наблюдать у одного и того же индивида, называют **интерсекс-состояниями**¹. Синдром нечувствительности к андрогенам — одно из нескольких возможных интерсекс-состояний, которые традиционно называют **псевдогермафродитизмом**. У псевдогермафродитов существует только один тип гонад (в отличие от «истинного» гермафродитизма, при котором у людей имеются гонады обоих полов), но вторичные половые признаки не соответствуют

тому, что можно было бы ожидать в результате гонадного определения пола. Другой тип псевдогермафродитизма, при котором гонадный пол является женским, но внешние половые признаки — мужские, может быть результатом избыточного синтеза андрогенов в яичнике или надпочечниках. Наиболее часто причиной последнего состояния является **врожденная гиперплазия надпочечников**, при которой существует генетический дефицит фермента, ответственного за метаболизм стероидного гормона кортизола в надпочечниках. В отсутствие этого фермента тестостеронподобные гормоны накапливаются и могут связываться с рецептором андрогена, таким образом маскулинизируя плод (Migeon and Wisniewski, 2000; Merke et al., 2002).

ДОЗОВАЯ КОМПЕНСАЦИЯ ПОЛОВОЙ ХРОМОСОМЫ

Инактивация X-хромосомы — важное событие при формировании женского фенотипа у млекопитающих. Млекопитающие должны регулировать количество продуктов генов, расположенных на X-хромосоме. У самок две X-хромосомы, а у самцов только одна. Если бы транскрипция была одинаковой, у женщин должно было быть вдвое больше мРНК генов, локализованных на X-хромосоме, чем у мужчин. Но этого не происходит. В целом мужчины и женщины имеют одинаковое количество продуктов генов, расположенных на X-хромосомах. Это достигается путем **инактивации X-хромосомы**. Случайным образом одна из X-хромосом инактивируется в каждой клетке, и потомки этих эмбриональных клеток сохраняют одну и ту же инактивированную X-хромосому. Эта случайная инактивация достигается путем превращения большей части ДНК одной X-хромосомы в транскрипционно неактивный гетерохроматин. Хотя детали инактивации X-хромосомы различны у мышей и людей, механизмы включают в себя работу длинных некодирующих РНК и размещение белков, ингибирующих гистоны, в нуклеосомах неактивной X-хромосомы (рис. 6.9; Migeon, 2013, 2017).

Подводя итоги, можно заключить, что гонадное определение пола у млекопитающих регулируют хромосомы и происходит образование семенников у особей с кариотипом XY и яичников у особей с кариотипом XX. Этот тип определения пола представляется «цифровым» (или-или) явлением. После установления хромосомного пола гонады вырабатывают

¹ В то время как применение бинарных категорий (разделение на мужчин и женщин) к людям удобно, биологическое признание интерсексуальности не ново (Fausto-Sterling, 1993; Suskin, 2002; Ainsworth, 2015). Термин «интерсекс», используемый для объединения этих состояний, активно обсуждают. Некоторые активисты, врачи, родители хотят исключить термин «интерсекс», чтобы избежать смешивания анатомических особенностей с проблемами самоидентификации, такими как гомосексуальность. Они предпочитают называть эти состояния термином «расстройства/различия при определении пола» (Kim and Kim, 2012). Напротив, другие не хотят рассматривать эту проблему как медицинскую и считают определение «расстройство» оскорбительным для людей, которые не считают, что с ними что-то не так. Для более подробного изучения интерсексуальности см. Dreger, 2000; Dreger et al., 2005 и Austin et al., 2011; также см. www.isna.org/faq/conditions.



Загадки развития

Друг хочет поспорить, является ли конкретная кошка черепаховой окраски самцом или самкой. Что вы выбираете? Если кошка окажется самцом, как вы думаете, какой у него набор половых хромосом?

А

ВО ВРЕМЯ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

Зигота с двумя
Х-хромосомами

Материнская
Х-хромосома

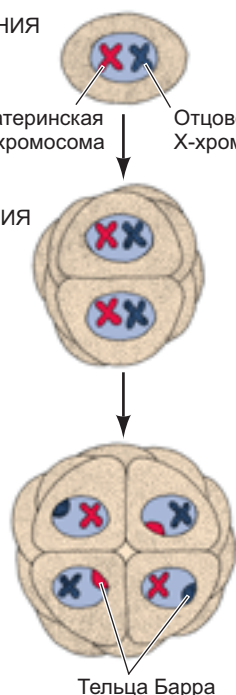
Отцовская
Х-хромосома

РАННИЕ СТАДИИ ДРОБЛЕНИЯ

Обе Х-хромосомы
активны во всех клетках

ИМПЛАНТАЦИЯ

Случайная инактивация
одной из Х-хромосом
во всех клетках
внутренней клеточной
массы, из которых
в дальнейшем
сформируется зародыш



Тельца Барра

Б



© iStock.com/cgbaldauf

Рис. 6.9. Инактивация Х-хромосомы у млекопитающих. **А.** Схема, показывающая случайную инактивацию Х-хромосомы. ДНК неактивной Х-хромосомы становится транскрипционно инертным гетерохроматином и часто оказывается связанной с ядерной оболочкой. Тельце Барра — неактивная Х-хромосома, которая окрашивается в темный цвет. **Б.** Кошка черепахового окраса с двумя (оранжевый и черный) аллелями гена, отвечающего за цвет шерсти и расположенного на Х-хромосоме. Цвет пятна (черный или оранжевый) зависит от того, какая Х-хромосома была инактивирована в клетке, которая дала начало другим пигментным клеткам в данной области

гормоны, которые оказывают влияние на формирование мужских или женских признаков в разных частях тела. Это вторичное определение пола является более «аналоговым», в результате чего разные уровни гормонов и различная чувствительность к гормонам могут создавать разные фенотипы. Таким образом, вторичное определение пола обычно, но не всегда совпадает с гонадным определением пола.

Хромосомное определение пола у *Drosophila*

Определение пола путем дозировки Х-хромосомы

У *Drosophila* формирование половых органов определено числом Х-хромосом в ядре клетки. Если в диплоидной клетке содержится только одна Х-хромосома, муха — самец, если две Х-хромосомы, то муха — самка. В то время как у млекопитающих особи с кариотипом Х0 являются стерильными самками (отсутствует Y-хромосома, следовательно, отсутствует ген *Sry*), у *Drosophila* особь с кариотипом Х0 — стерильный самец (одна Х-хромосома на диплоидный набор). Поскольку у *Drosophila* нет никаких гормонов, влияющих на формирование внешних половых признаков, определение пола у нее и у насекомых в целом является «цифровым», причем каждая клетка представляет собой минимальный элемент (пиксель). Действительно, у насекомых, ракообразных и даже у некоторых птиц можно на-

блюдать **гинандроморфов** — животных, у которых одни области тела — мужские, а другие — женские (**рис. 6.10**). Гинандроморфы у плодовых мух появляются, когда Х-хромосома теряется из одного эмбрионального ядра. Потомки этой клетки, вместо того чтобы обладать кариотипом ХХ (самка), несут кариотип Х0 (самец). Клетки с кариотипом Х0 формируют мужские признаки, тогда как клетки с кариотипом ХХ формируют женские признаки, что позволяет предположить, что у *Drosophila* каждая клетка сама принимает «решение» о половой принадлежности. Действительно, в своем классическом обсуждении гинандроморфов Морган и Бриджес (1919) пришли к выводу: «Мужские и женские части и их половые признаки строго самоопределяются, каждая развивается в соответствии с собственным стремлением», каждое решение «не является результатом воздействия соседних клеток и при этом не отменяется воздействием половых желез». Хотя некоторые органы представляют собой исключения из этого правила (особенно внешние половые органы), эти исключения подтверждают общий принцип формирования пола у *Drosophila*.

Ген *Sex-lethal*

Недавно проведенные молекулярно-биологические исследования позволяют предполагать, что основным фактором определения пола у диплоидных насекомых является число Х-хромосом (Erickson and Quintero, 2007; Moschall et al., 2017). На Х-хромосоме расположены гены, кодирующие транскрипцион-

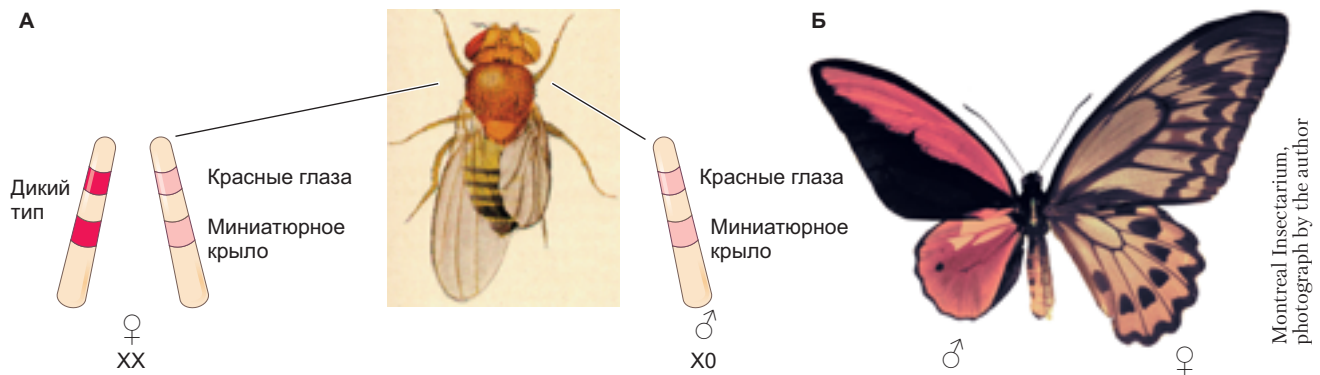


Рис. 6.10. Насекомые-гинандроморфы. **А.** *Drosophila melanogaster*, у которой левая половина тела женская (XX), а правая — мужская (X0). Клетки мужской половины потеряли X-хромосому, которая несла аллели дикого типа, кодирующие цвет глаз и форму крыла; таким образом разрешается экспрессия рецессивных аллелей, расположенных на оставшейся X-хромосоме и кодирующих красный цвет глаз и миниатюрный размер крыльев. **Б.** Бабочка птицекрылка *Ornithoptera croesus*. Мужская половина тела меньшего размера и окрашена в красный, черный и желтый цвета, в то время как женская половина более крупная и окрашена в коричневый и черный цвета. (Рисунок Э. Уоллес из: Т. Н. Morgan and C. B. Bridges., 1919. В работе: *Contributions to the Genetics of Drosophila*. Publication no. 278, pp. 1–122. Carnegie Institution of Washington: Washington, DC.)

ные факторы, которые активируют гены, играющие ключевую роль при определении пола у *Drosophila*, в частности, X-сцепленный локус **Sxl** (*sex-lethal*). Белок **Sxl** является фактором сплайсинга РНК, который запускает каскад процессинга РНК, приводя к формированию определенных половых признаков (рис. 6.11).

АКТИВАЦИЯ SEX-LETHAL

Число X-хромосом служит ключевым фактором активации (или не активации) ранней экспрессии гена *Sxl*. *Sxl* кодирует фактор сплайсинга РНК, который будет регулировать развитие гонад, а также уровень экспрессии генов, расположенных на X-хромосоме. У данного гена два промотора. Ранний промотор активен только в клетках с кариотипом XX; более поздний промотор активен в клетках с кариотипом как XX, так и XY. На X-хромосоме, по-видимому, расположены гены, кодирующие четыре белковых фактора, которые активируют ранний промотор *Sxl* (см. рис. 6.11). Если эти факторы накапливаются в количестве, превышающем определенный пороговый уровень, ген *Sxl* активируется через его ранний промотор (Erickson and Quintero, 2007; Gonz  les et al., 2008; Mulvey et al., 2014). В результате происходит транскрипция *Sxl* во время ранних этапов развития эмбрионов с кариотипом XX (но не XY) (рис. 6.12).

В пре-РНК *Sxl*, считываемой с раннего промотора эмбрионов с кариотипом XX, отсутствует экзон 3, содержащий стоп-кодон. Таким образом, белок Sxl, который вырабатывается на ранних стадиях, лишен экзона 3, поэтому в ранних эмбрионах с кариотипом XX синтезируется полноценный и функциональный

белок Sxl (см. рис. 6.12). У эмбрионов с кариотипом XY ранний промотор *Sxl* неактивен и функциональный белок Sxl отсутствует.

Однако позже по мере развития активируется поздний промотор и ген *Sxl* транскрибируется как у самцов, так и у самок. В клетках с кариотипом XX белок Sxl с раннего промотора уже синтезирован и может связываться с недавно транскрибированной пре-мРНК *Sxl* (синтезированной с позднего промотора) и направить ее сплайсинг по «женскому» пути. В этом случае Sxl связывается и блокирует сплайсинговый комплекс на экзоне 3 (Johnson et al., 2010; Salz, 2011). В результате экзон 3 оказывается пропущенным и не включенным в мРНК *Sxl*. Таким образом, ранний синтез обеспечивает получение функционального полноразмерного белка в клетках с кариотипом XX (Bell et al., 1991; Keyes et al., 1992). В клетках с кариотипом XY ранний промотор неактивен (так как транскрипционные факторы, кодируемые на X-хромосоме, не достигают концентрации, необходимой для активации раннего промотора), и ранний белок Sxl не синтезируется. Следовательно, пре-мРНК *Sxl* в клетках с кариотипом XY подвержена сплайсингу таким образом, что содержит экзон 3 и его терминирующий кодон. Синтез белка завершается на экзоне 3, в результате чего образуется нефункциональный белок Sxl.

МИШЕНИ SEX-LETHAL

Белок, полученный с помощью специфичного для самок транскрипта *Sxl*, содержит участки, необходимые для взаимодействия с РНК. По-видимому, существуют три основные РНК-мишени, с которыми

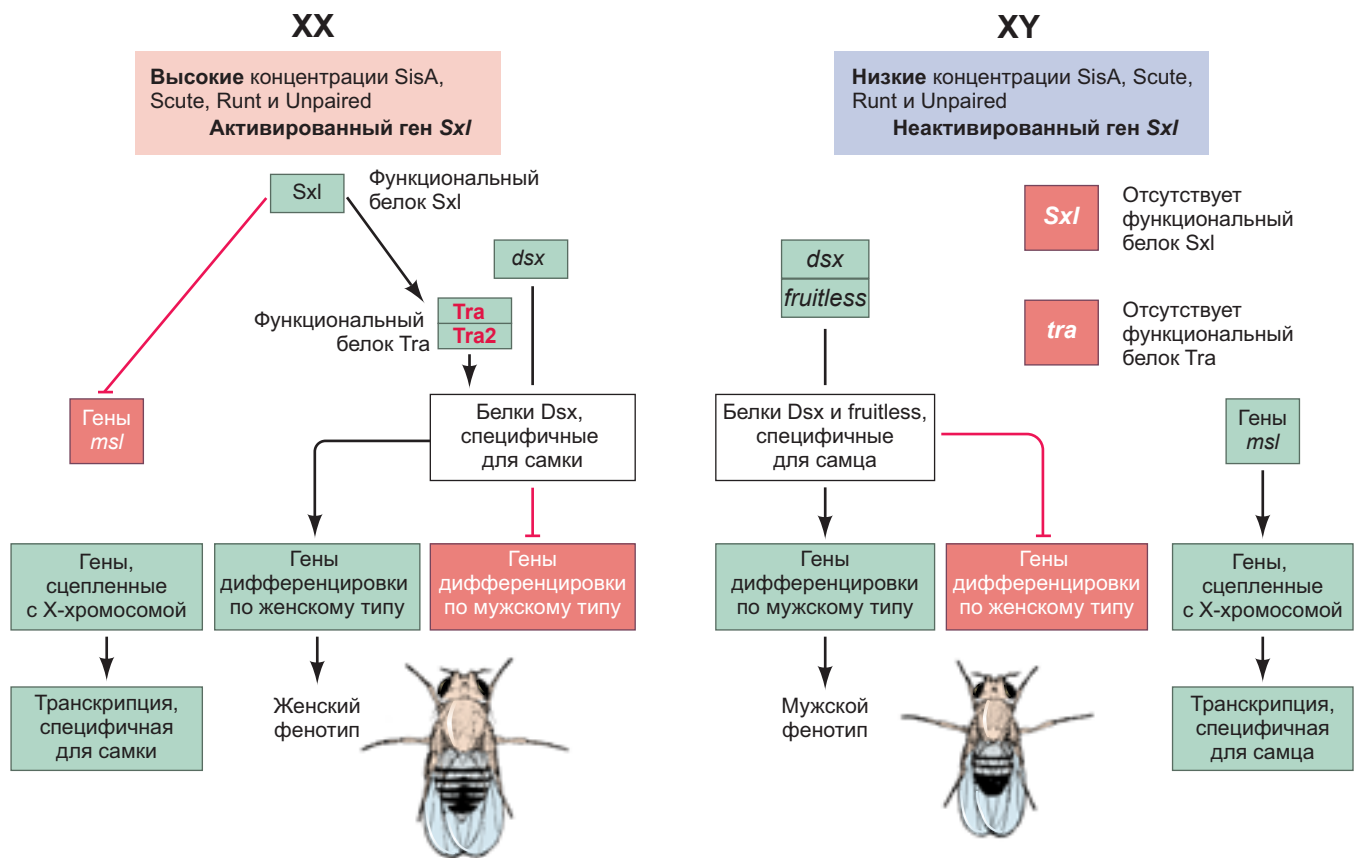


Рис. 6.11. Предложенный регуляторный каскад определения соматического пола у *Drosophila*. Транскрипционные факторы, синтезируемые с X-хромосомы, активируют ген *Sxl* у самок (XX), но не у самцов (XY). Белок *Sxl* выполняет три основные функции. Во-первых, он активирует собственную транскрипцию, обеспечивая дальнейшую продукцию *Sxl*. Во-вторых, репрессирует трансляцию мРНК *msl2* — фактора, облегчающего транскрипцию с X-хромосомы. Это позволяет уравнивать транскрипцию с двух X-хромосом у самок с транскрипцией с одной X-хромосомы у самцов. В-третьих, *Sxl* обеспечивает сплайсинг пре-мРНК *transformer-1 (tra1)* в функциональные белки. Белки *Tra* осуществляют процессинг пре-мРНК *doublesex (dsx)* специфичным для самок способом, что обеспечивает формирование женского фенотипа. (По данным: B. S. Baker et al., 1987. *BioEssays* 6: 66–70.)

связывается специфичный для самок транскрипт *Sxl*. Одной из них, как уже упоминалось, является пре-мРНК самого *Sxl*. Другая мишень — ген *msl2*, контролирующий дозовую компенсацию. Действительно, если ген *Sxl* не функционален в клетке с двумя X-хромосомами, система дозовой компенсации не будет работать и результатом окажется гибель клетки (отсюда и название гена). Третьей мишенью служит пре-мРНК *transformer (tra)* — следующего гена в каскаде определения пола (рис. 6.13; Nagoshi et al., 1988; Bell et al., 1991).

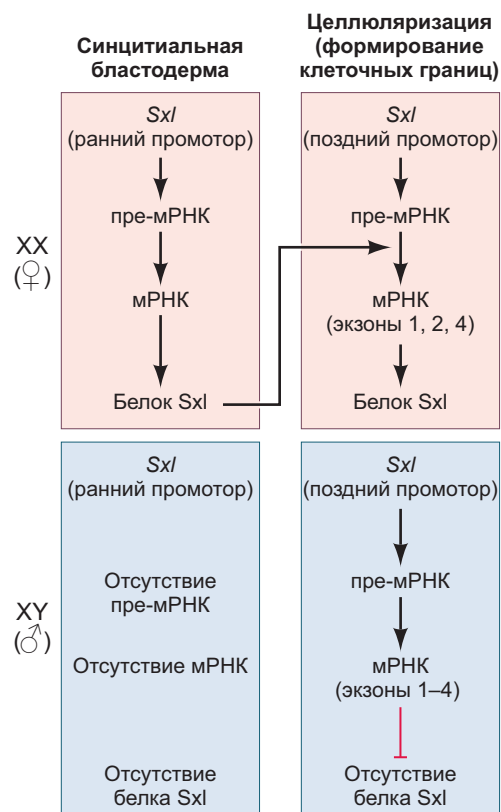
Пре-мРНК гена *transformer* (ген назван так потому, что мутации в нем, вызывающие потерю функции, превращают самок в самцов) в результате сплайсинга превращается в функциональную мРНК при помощи белка *Sxl*. Пре-мРНК *tra* синтезируется в клетках как самок, так и самцов. Однако в присутствии *Sxl* транскрипт *tra* подвергается альтернативному сплайсингу для создания специфичной для самок мРНК, а также

неспецифичной мРНК, которую обнаруживают как у самок, так и у самцов. У самцов неспецифичная мРНК *tra* содержит ранний терминальный кодон, который делает белок нефункциональным, так же как и у *Sxl* (Boggs et al., 1987). В *tra* экзон 2 неспецифичной мРНК содержит терминальный кодон и не функционирует в клетках самок (см. рис. 6.11 и 6.13).

Doublesex: ген переключения определения пола

У *Drosophila* ген *doublesex (dsx)* активен как у самцов, так и у самок. Он экспрессируется в тех клетках, которые обладают функциональными или анатомическими половыми различиями (Verhulst and van de Zande, 2015). Тем не менее основной транскрипт *dsx* претерпевает процессинг в зависимости от пола

Рис. 6.12. Дифференциальный сплайсинг РНК и экспрессия *Sex-lethal* у особей разного пола. На стадии ранней бластулы (стадия синцитиальной бластодермы) у мух с кариотипом XX для активации раннего промотора гена *Sxl* достаточно транскрипционных факторов, считываемых с двух X-хромосом. Ранний транскрипт в результате сплайсинга превращается в мРНК, лишённую экзона 3, с которой синтезируется функциональный белок Sxl. У мух с кариотипом XY ранний промотор не активируется, следовательно, у самцов отсутствует функциональный белок Sxl. На более поздней стадии (стадия целлюляризации — формирования клеточных границ) поздний промотор гена *Sxl* активен и у самцов, и у самок. У мух с кариотипом XX белок Sxl, присутствующий в эмбрионе, предотвращает сплайсинг экзона 3 в мРНК, в результате чего образуется функциональный белок Sxl. Затем Sxl связывается с собственным промотором, чтобы поддерживать его в активном состоянии; так же он работает при сплайсинге нижестоящих пре-мРНК. У эмбрионов с кариотипом XY Sxl отсутствует, следовательно, происходит сплайсинг экзона 3. Так как в этом экзоне содержится терминальный кодон, у самцов не образуется функциональный белок Sxl. (По данным: Н. К. Salz, 2011. *Curr Opin Genet Dev* 21: 395–400.)



(Baker et al., 1987). Этот альтернативный процессинг РНК является результатом воздействия продуктов генов *tra* и *tra²* на ген *dsx* (см. рис. 6.12 и 6.14). Если присутствуют оба белка: Tra² и присутствующий только у самок Tra, РНК *dsx* подвергается процессингу специфичным для самок способом (Ryder and Baker, 1991). У самок в результате специфичного сплайсинга синтезируется белок Doublesex, содержащий домены, которые позволяют взаимодействовать с другими белками, что необходимо для активации генов, сцепленных с полом (например, белков, формирующих желток). Если не синтезируется функциональный Tra, пре-мРНК *dsx* претерпевает иной вариант сплайсинга, в результате чего образуется специфичный для самцов транскрипт *dsx*. С данного транскрипта синтезируется белок, содержащий домены, специфичные для самцов. Они необходимы для взаимодействия с другими, нежели у самок, белками, чтобы происходила активация генов, отвечающих за формирование мужских признаков. По-видимому, белки Doublesex как самок (DsxF), так и самцов (Dsx^M) взаимодействуют с одними и теми же энхансерами. DsxF в сочетании с другими белками активирует специфичные для самок гены и репрессирует специфичные для самцов гены. И наоборот, Dsx^M взаимодействует с другим набором факторов, способствующих экспрессии специфичных для самцов генов и подавляющих экспрессию генов, специфичных для самок.

Согласно описанной модели каскад определения пола, представленный на рис. 6.12, связан с типом

мРНК, которая возникает в результате процессинга транскрипта *doublesex*. Если имеется две X-хромосомы, транскрипционные факторы, активирующие ранний промотор *Sxl*, достигают критической концентрации и с *Sxl* синтезируется фактор, который регулирует сплайсинг транскрипта гена *transformer*, реализуемый только у самок. Этот специфичный для самок белок взаимодействует с фактором сплайсинга *tra²*, что приводит к образованию пре-мРНК *dsx*, также специфичной для самок¹. В том случае, когда транскрипт *dsx* не подвергается такому сплайсингу, «по умолчанию» образуется РНК, специфичная для самцов. Любопытно, что ген *doublesex* мух очень похож на ген *Dmrt1* позвоночных, следовательно, эти два способа определения пола могут иметь общие черты.

Определение пола в зависимости от внешних факторов

У многих организмов пол определяют факторы окружающей среды, такие как температура, расположение и присутствие других представителей вида. Ниже мы

¹ Так как белок Tra различается у особей разного пола (функционален у самок и нефункционален у самцов), он тоже может быть использован при определении пола. Это происходит у личинок *Drosophila*, у которых быстрое увеличение женских клеток имеет место из-за синтеза Tra в мозге и жировом теле. Процесс не зависит от Dsx (Rideout et al., 2015; Mathews et al., 2017).

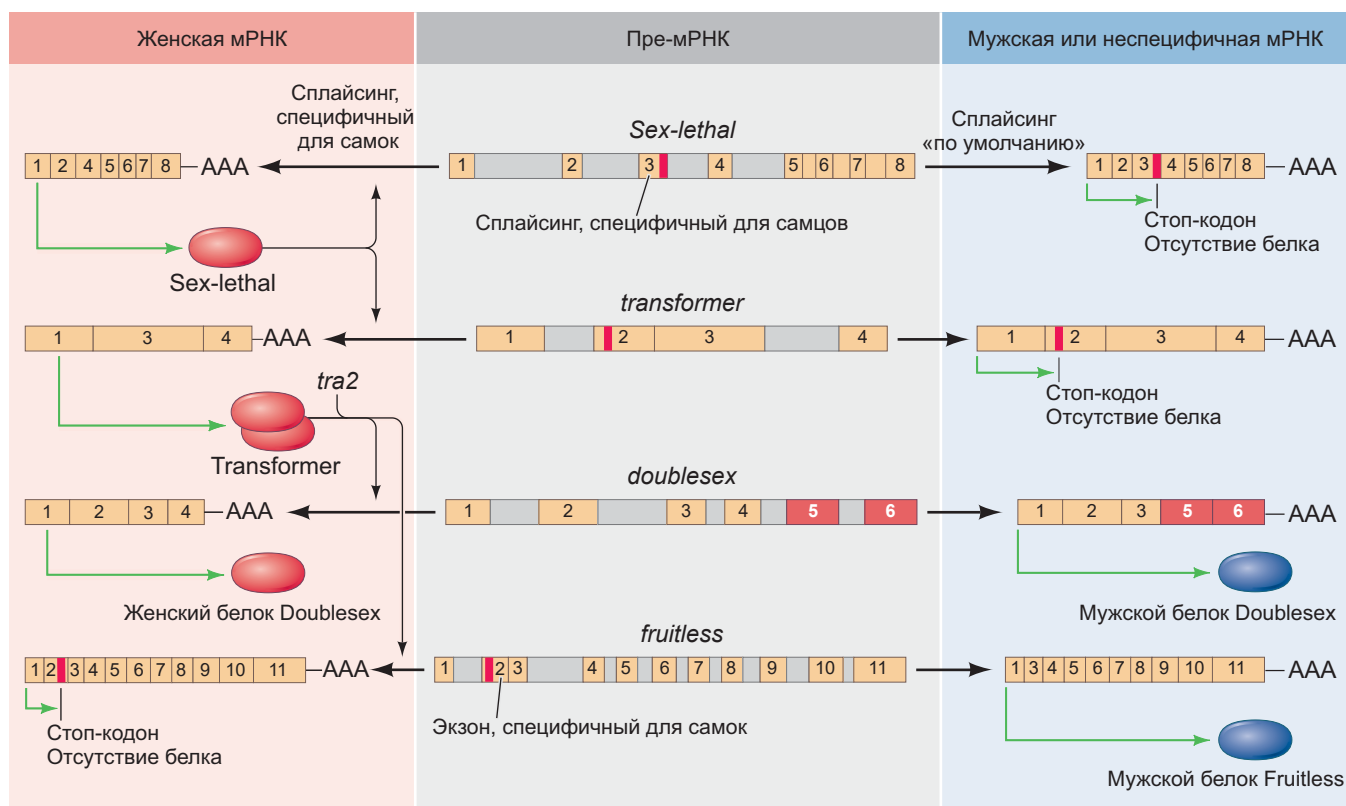


Рис. 6.13. Специфичный в зависимости от пола сплайсинг РНК четырех основных генов, участвующих в определении пола у *Drosophila*. Пре-мРНК (показаны в центре диаграммы) одинаковы как в мужском, так и в женском ядре. В каждом случае транскрипт, специфичный для самок, показан слева, а транскрипт «по умолчанию» (специфичный для самцов или неспецифичный) — справа. Экзоны пронумерованы, положения терминальных кодонов отмечены. *Sex-lethal*, *transformer* и *doublesex* — участники генетического каскада гонадного определения пола. Паттерн транскрипции *fruitless* определяет особенности брачного поведения. Белки *transformer* принимают участие в сплайсинге пре-мРНК *fruitless*, для того чтобы синтезировались мужская и женская формы белка в *fruitless* в головном ганглии мух. (По данным: B. S. Baker, 1989. *Nature* 340: 521–524 и B. S. Baker et al., 2001. *Cell* 105: 13–24.)

рассмотрим определение пола у черепах в зависимости от температурного режима.

Пол большинства черепах, всех аллигаторов и крокодилов определяют факторы среды, окружающей эмбрион *после* оплодотворения. У рептилий температура яиц во время определенного периода развития служит критическим фактором определения пола и даже небольшие изменения температурного режима могут привести к существенным изменениям в соотношении полов (Bull, 1980; Crews, 2003). Часто из яиц, инкубированных при низких температурах, развиваются особи одного пола, а из яиц, инкубированных при более высоких температурах, — другого. Существует только небольшой диапазон температур, позволяющий самцам и самкам вылупляться из одной кладки¹.

¹ Определение пола, связанное с температурой, в условиях текущего периода глобального изменения климата подвергает риску исчезновения черепах и крокодилов (Jensen et al. 2018). Эволюционные преимущества и недостатки температурного определения пола будут обсуждены в гл. 24.

На **рис. 6.14** представлено резкое изменение соотношения полов для трех видов рептилий, включая красноухую черепаху (*Trachemys scripta elegans*), вызванное температурным фактором. Если кладку *Trachemys* инкубировать при температурах ниже 28 °С, то почти все вылупившиеся особи будут самцами. Инкубация при температуре выше 31 °С приводит к развитию самок. Инкубация кладки при температурах внутри описанного диапазона обеспечивает развитие как самок, так и самцов. Однако возможны вариации. Например, из яиц грифовой черепахи *Macrolemys temminckii* при пониженных температурах (22 °С и ниже) или, наоборот, более высоких (28 °С и выше) развиваются самки, а при температурах от 22 до 28 °С — самцы.

Красноухая черепаха стала одним из лучших видов для изучения влияния факторов окружающей среды на определение пола, так как относится к немногим видам черепах, которым не угрожает разрушение среды обитания. (Действительно, этих черепах, купленных в зоомагазинах, часто выпуска-

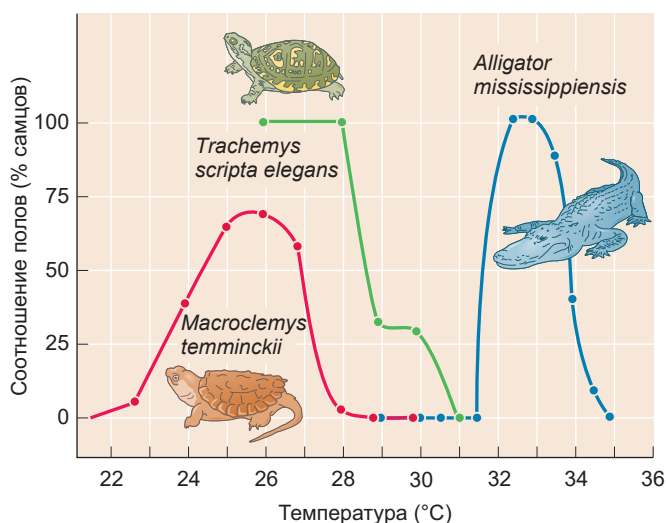


Рис. 6.14. Определение пола у трех видов рептилий: американского аллигатора (*Alligator mississippiensis*), красноухой черепахи (*Trachemys scripta elegans*) и грифовой черепахи (*Macrolemys temminckii*) в зависимости от температуры. (По данным: D. A. Crain and L. J. Guillelte, Jr., 1998. *Anim Reprod Sci* 53: 77–86. Из: M. A. Ewert et al., 1994. *J Exp Zool* 270: 3–15 и J. W. Lang and H. V. Andrews, 1994. *J Exp Zool* 270: 28–44.)

ют на волю, где они могут захватывать территорию обитания (пруд) других видов, вытесняя их.) Вторая треть всего периода развития представляется наиболее важной при определении пола — считается, что черепахи не могут изменить пол после прохождения этой стадии.

Более 50 лет ученые пытались найти чувствительные к температуре генные сети, которые принимают участие в формировании семенников и яичников у черепах (Shoemaker et al., 2007; Bieser and Wibbels, 2014). В последнее время интерес был сосредоточен на гене, кодирующем *Dmrt1*. Как вы помните, *Dmrt1* — ген позвоночных, родственный гену *doublesex* у *Drosophila*. У позвоночных белок *Dmrt1*, по-видимому, запускает каскад дифференцировки семенников у многих видов рыб, амфибий и птиц (Matson and Zarkower, 2012). Он отвечает и за поддержание популяции клеток Сертоли в семенниках млекопитающих (Matson et al., 2011). У *Trachemys* *Dmrt1* экспрессируется в зачатке гонады непосредственно перед половой дифференцировкой. На высоком уровне он экспрессируется в гонадах эмбрионов, содержащихся при температурах, при которых дифференцируются семенники (26 °C); при более высоких температурах (32 °C), при которых развиваются яичники, уровень экспрессии данного гена очень низкий (Ge et al., 2017). Если в условиях эксперимента подавить экспрессию *Dmrt1* (например, при помощи вируса), то зачаток гонады разовьется в яичник. Однако если в эти зачатки гонад с подавленной экспрессией ввести белок *Dmrt1*, они разовьются в семенники.

Тогда возникает вопрос: чем регулируется *Dmrt1*? Недавние эксперименты (Ge et al., 2018) показывают, что экспрессию *Dmrt1* положительно регулирует удаление определенной метильной группы из нуклеосом на ее промоторе, а данную реакцию катализирует фермент KDM6B. При температурах, необходимых для развития самцов, происходит активация гена *Kdm6b* на стадиях, когда происходит половая дифференцировка гонады (рис. 6.15). Однако мы все еще не знаем, какие факторы, регулируемые температурой, активируют KDM6B.

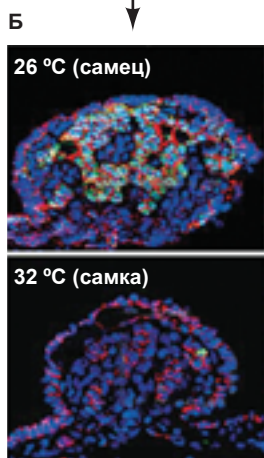
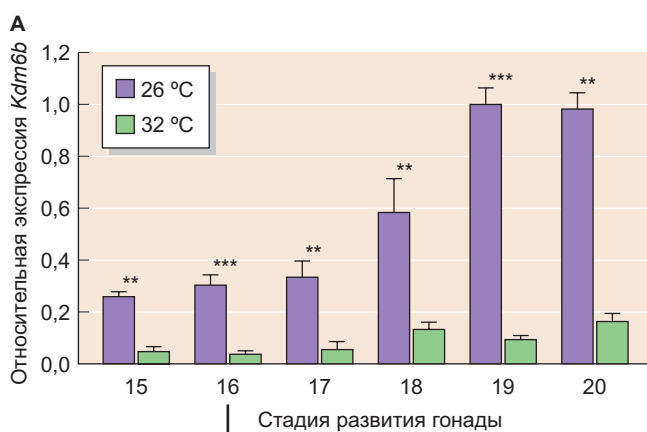


Рис. 6.15. Активация каскада определения пола у красноухой черепахи. Гистоновая деметилаза KDM6B связана с температурным определением пола. **А.** Количественный анализ мРНК *Kdm6b* в гонадах эмбрионов черепах, инкубированных при температурах (26 °C), при которых развиваются самцы, или при температурах (32 °C), при которых развиваются самки. При низких температурах (когда развиваются самцы) наблюдается существенное увеличение количества мРНК *Kdm6b* в эмбрионах в течение всего периода половой дифференцировки. ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$. **Б.** Иммунофлуоресцентное выявление белка KDM6B в гонаде на 16-й стадии. мРНК *Kdm6b* окрашена в зеленый и дает светло-голубой цвет при использовании синего ядерного красителя DAPI. Красным покрашен β -катенин, который находится на поверхности мужских клеток, но в ядре и цитоплазме — в клетках самок. (По данным: С. Ge et al., 2018. *Science* 360: 645–648.)

Гаметогенез у животных

Одно из важнейших событий в определении пола — **гаметогенез** — дифференцировка половых клеток в гаметы: сперматозоиды и яйцеклетки. Именно **первичные половые клетки (ППК)** являются бипотенциальными предшественниками как яйцеклеток, так и сперматозоидов. Если ППК находятся в яичниках, то превращаются в яйцеклетки, если в семенниках — в сперматозоиды. Эти превращения находятся под контролем факторов, синтезируемых развивающимися гонадами.

Один из самых удивительных факторов, касающихся половых клеток, заключается в том, что они обеспечивают преемственность поколений. Взрослое тело погибает, но линия половых клеток образует гаметы, создающие новое тело, которое также погибнет. Незрелые сперматозоиды или яйцеклетки в вашем организме происходят из такой же линии половых клеток, которая была заложена в гонадах рептилий, земноводных (амфибий), рыб и беспозвоночных.

В то же время, клетки, из которых будут сформированы сперматозоиды и яйцеклетки, изначально образуются вне гонад. У *Drosophila* и млекопитающих они закладываются в задней части эмбриона и мигрируют в зачатки половых желез (Anderson et al., 2000; Molyneaux et al., 2001; Tanaka et al., 2005). Это достаточно распространенная ситуация в животном мире: половые клетки «отделены» от остальных клеток эмбриона, а транскрипция и трансляция в них заблокированы, пока они мигрируют из периферии зародыша в гонаду. Создается впечатление, что половые клетки специально сохраняются для следующего поколения, а подавление экспрессии генов делает их нечувствительными к межклеточным взаимодействиям, происходящим вокруг (Richardson and Lehmann, 2010; Tarbashevich and Raz, 2010).

Хотя механизмы, используемые для обособления линии половых клеток, существенно различаются внутри царства животных, белки, синтезируемые половыми клетками для подавления экспрессии генов,

достаточно консервативны. Вместе с белками из семейств Vasa, Nanos, Tudor и Piwi их можно обнаружить в половых клетках стрекающих, мух и млекопитающих (Ewen-Campen et al., 2010; Leclère et al., 2012). Белки Vasa, которые, по-видимому, активируют гены, специфичные для половых клеток, необходимы почти всем исследованным животным. Nanos участвует в подавлении трансляции и предотвращении гибели клеток (Kobayashi et al. 1996; Hayashi et al. 2004).

Не менее важно, что сигнал, индуцирующий формирование ППК, также консервативен в животном мире. У млекопитающих и тех насекомых, у которых происходит индукция образования половых клеток (например, у сверчков), сигнал BMP необходим для их формирования (Donoughe et al., 2014; Lochab and Extravouir, 2017). У млекопитающих BMP4, выделяемый клетками внезародышевых оболочек, побуждает мезенхимальные клетки превращаться в ППК, активируя те гены, которые определяют клетки как половую линию, и одновременно блокируя экспрессию тех генов, которые мешают клеткам стать частью половой линии (Fujiwara et al., 2001; Saito and Yamaji, 2012; Zhang et al., 2018). Эта стратегия активации одного набора генов при одновременном подавлении других сходна с той, которая имеет место при гонадном определении пола у млекопитающих.

ППК млекопитающих: от половых валиков до гонад

У млекопитающих *de novo* образовавшиеся ППК сначала проникают в заднюю кишку и в конечном счете мигрируют в переднем направлении в сторону индифферентных гонад, пролиферируя по мере перемещения (**рис. 6.16**). Со времени их обособления до заселения половых валиков ППК окружены клетками, выделяющими фактор стволовых клеток (stem cell factor, SCF). Фактор необходим для обеспечения миграционной

ТАБЛИЦА 6.1

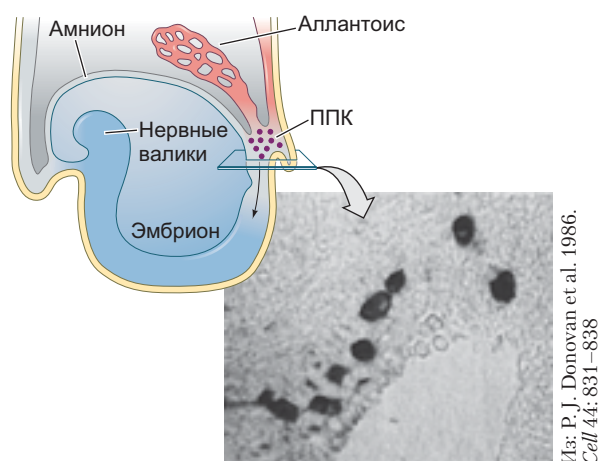
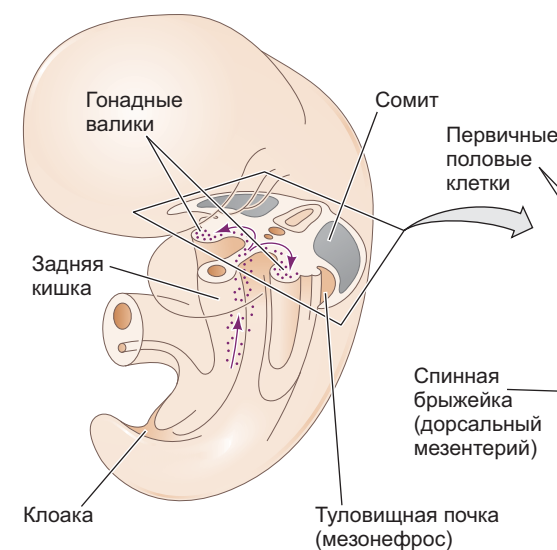
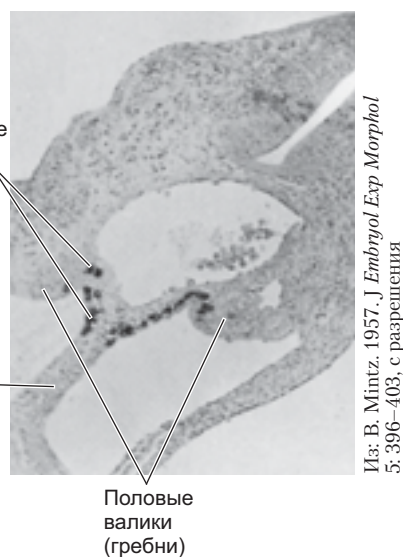
Оогенез

Мейоз запускается один раз в ограниченной популяции клеток
Одна половая клетка образуется в результате мейоза
Завершение мейоза откладывается на месяцы или годы
Мейоз останавливается на профазе I деления и заново запускается в меньшей популяции клеток
Дифференцировка половых клеток происходит во время профазы I деления мейоза, когда клетки еще диплоидны
Все хромосомы во время профазы одинаково подвергаются транскрипции и рекомбинации

Сперматогенез

Мейоз запускается непрерывно в популяции стволовых клеток, делящихся митозом
Во время мейоза образуется четыре половые клетки
Мейоз завершается в течение дней или недель
Мейоз и дифференцировка протекают непрерывно без остановки клеточного цикла
Дифференцировка половых клеток происходит после завершения мейоза, когда клетки стали гаплоидными
Половые хромосомы не подвергаются рекомбинации и транскрипции во время профазы I деления мейоза

По данным: M. A. Handel and J. J. Eppig, 1998. *Curr Topics Dev Biol* 37: 333–358.

А Миграция ППК в энтодерму**Б** Миграция ППК в гонаду**В**

способности и выживания ППК. Более того, выделяющие его клетки, по-видимому, мигрируют вместе с ППК, формируя «перемещающуюся нишу», поддерживающую выживание, деление и миграцию ППК (Gu et al., 2009). Как только они заселяют гонаду, эти клетки попадают под воздействие ВМР — факторов, создающих условия для формирования ниши в половом валике (Dudley et al., 2007, 2010).

Под действием сигналов от гонад ППК приступают затем либо к **оогенезу** (формированию яйцеклеток), либо к **сперматогенезу** (формированию сперматозоидов) (табл. 6.1). Принципиальное различие между самцами и самками млекопитающих состоит во времени прохождения мейоза. У самок мейоз начинается в гонадах еще на этапе эмбрионального развития. У самцов он не начинается до наступления полового созревания. «Привратником» мейоза, по-видимому, является транскрипционный фактор *Stra8*, который запускает новый раунд синтеза ДНК и мейоз в половых клетках. В развивающихся яичниках белок *Stra8* активируют два фактора — *Wnt4*

Рис. 6.16. Миграция первичных половых клеток мыши. **А.** На восьмые сутки эмбрионального развития ППК, заложенные в задней части эпибласта, мигрируют в definitive энтодерму эмбриона. На фотографии показаны крупные ППК (окрашенные для определения щелочной фосфатазы) в задней кишке эмбриона мыши. **Б.** ППК мигрируют через кишку дорсально в половые валики. **В.** Клетки, окрашенные для определения щелочной фосфатазы, заселяют половой валик на одиннадцатые сутки развития. (По данным: J. Langman, 1981. *Medical Embryology*, 4th Ed. Williams & Wilkins: Baltimore.)

и ретиноевая кислота (РК), которые синтезируются в рядом расположенной почке (Baltus et al., 2006; Bowles et al., 2006; Naillat et al., 2010; Chassot et al., 2011). В развивающихся семенниках *Stra8* подавляется *Fgf9*, а ретиноевую кислоту, вырабатываемую в развивающейся почке, разрушает фермент *Cyp26b1*, секретируемый семенником (рис. 6.17; Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). Однако в период полового созревания у самца ретиноевая кислота, синтезируемая клетками Сертоли, активирует *Stra8* в сперматогонияльных стволовых клетках. В присутствии *Stra8* клетки-предшественники сперматозоидов становятся готовыми к мейозу (Anderson et al., 2008; Mark et al., 2008; Nakagawa et al., 2017).

Мейоз: переплетение жизненных циклов

Мейоз, вероятно, самое революционное изобретение эукариот, поскольку представляет собой механизм передачи генов от одного поколения другому и ре-

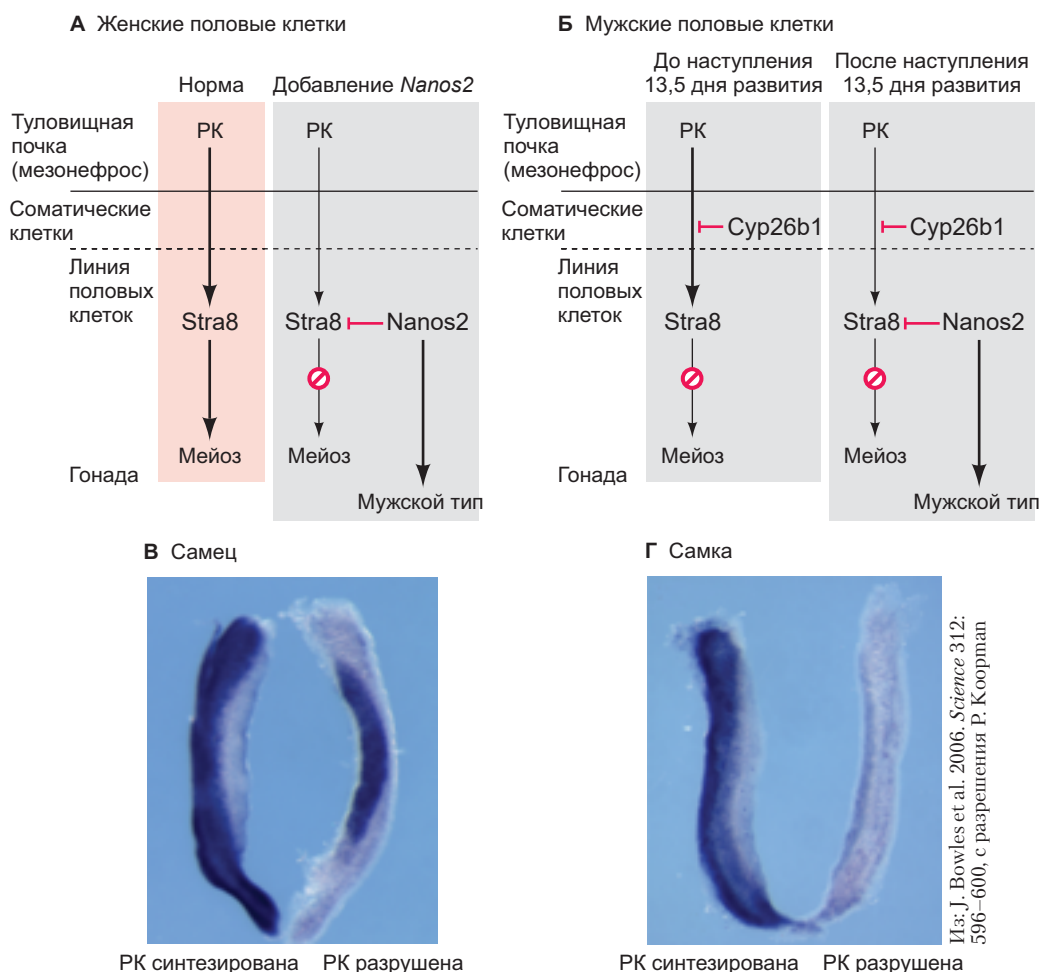


Рис. 6.17. Ретиновая кислота принимает участие в регуляции времени наступления мейоза и дифференцировки половых клеток млекопитающих. **А.** У мышиных эмбрионов женского пола РК, секретлируемая мезонефросом (туловищной почкой), влияет на гонады и запускает мейоз посредством активации транскрипционного фактора *Stra8* в женских половых клетках (розовый). Однако, если внести в женские половые клетки активированный ген *Nanos2*, произойдет подавление экспрессии *Stra8*, приводящее к дифференцировке половых клеток по мужскому типу (показано серым). **Б.** В эмбриональных семенниках *Cyp26b1* ингибирует РК, предотвращая запуск мейоза в мужских половых клетках до 13,5 суток эмбрионального развития (панель слева). После наступления 13,5 дня развития уровень экспрессии *Cyp26b1* снижается, *Nanos2* экспрессируется и останавливает запуск мейоза, ингибируя экспрессию *Stra8*. Это приводит к дифференцировке половых клеток по мужскому типу (панель справа). **В, Г.** Эмбрионы мыши на 12-е сутки развития, окрашенные на мРНК фермента *Aldh1a2*, синтезирующего РК (левая гонада), и фермента *Cyp26b1*, разрушающего РК (правая гонада). Фермент, отвечающий за синтез РК, выявлен в мезонефросе как самцов (**В**), так и самок (**Г**); фермент, разрушающий РК, выявлен только в мужских гонадах. (Рис. А, Б из: Y. Saga, 2008. *Curr Opin Genet Dev* 18: 337–341.)

комбинации генов, содержащихся в сперматозоидах и яйцеклетках, в новые комбинации аллелей. Наблюдения Ван Бенедена, сделанные в 1883 г., о том, что в результате деления половых клеток в образовавшихся гаметах содержится половина диплоидного числа хромосом, продемонстрировали, что хромосомы потомства происходят в равных количествах из ядер двух конъюгирующих половых клеток и, следовательно, в равной степени от двух родителей (Wilson, 1924). Мейоз — критическая начальная и конечная

точки жизненного цикла. Половое размножение, эволюционные изменения и передача признаков от одного поколения к другому сводятся к мейозу. Чтобы понять, что делают половые клетки, мы должны сначала разобраться в мейозе.

Мейоз — это способ, с помощью которого половые клетки уменьшают вдвое число своих хромосом. В гаплоидном состоянии каждая клетка имеет только по одной копии хромосом, тогда как диплоидные клетки имеют две копии каждой хромосомы. Это

изменение происходит в результате одного раунда репликации ДНК, за которым следуют два последовательных деления.

После завершения последнего митотического деления половых клеток наступает период синтеза ДНК и клетки, приступающие к мейозу, удваивают количество ДНК в ядре. В этом случае каждая хромосома состоит из двух **сестринских хроматид**, соединенных общим кинетохором¹. Во время первого из двух делений мейоза (мейоз I) происходит разделение гомологичных хромосом (например, двух копий третьей хромосомы в диплоидной клетке) по двум разным клеткам. Следовательно, во время первого деления мейоза происходит *разделение гомологичных хромосом между двумя дочерними клетками* так, что каждая дочерняя клетка получает только одну копию каждой хромосомы, поэтому эти клетки гаплоидны. Но хромосома уже была реплицирована (т. е. состоит из двух хроматид), поэтому во время второго деления мейоза (мейоз II) происходит *разделение двух сестринских хроматид*. Конечный результат мейоза — получение четырех клеток, несущих гаплоидный набор нереплицированных хромосом.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Стадии мейоза

Первое деление мейоза начинается с длинной профазы, которая подразделяется на четыре стадии (**рис. 6.18А**). Во время **лептотены** (в пер. с греч. — тонкая нить) хроматин организован в виде очень тонких нитей, так что невозможно различить отдельные хромосомы. Однако репликация ДНК уже прошла, и каждая хромосома состоит из двух параллельных хроматид. Гомологичные хромосомы начинают спариваться благодаря нитям цитоскелета, проходящим от цитоплазмы в ядро и прикрепляющимся к кинетохорам. Таким образом, цитоскелет может перемещать хромосомы (Wynne et al., 2012; Burke, 2018). Ядерная оболочка, по-видимому, также важна для обеспечения возможности спаривания гомологичных хромосом (Comings, 1968; Scherthan, 2007; Tsai and McKee, 2011). На стадии **зиготены** (в пер. с греч. — соединенные нити) гомологичные хромосомы, теперь уже собранные вместе, начинают выстраиваться бок о бок. Такое тесное спаривание, называемое **сиnapсисом**, — характерная черта мейоза. Его, по-видимому, запускают двухцепочечные разрывы ДНК (аналогичные тем, которые используются для репарации ДНК). Разрывы позволяют «щупальцам» одноцепочечной ДНК переходить от одной хромосомы к другой

(Zickler and Leckner, 2015). Хотя механизмы, посредством которых каждая хромосома распознает гомологичную себе, не вполне понятны, сиnapсис требует наличия ядерной оболочки и образования белкового комплекса, называемого **сиnapтонемным комплексом** (**рис. 6.19А, Б**; von Wettstein, 1984; Duncce et al., 2018). Конфигурацию, образованную четырьмя хроматидами и сиnapтонемным комплексом, называют **тетрадой** или **бивалентом**.

Во время следующей стадии профазы мейоза, **пахитены** (от греч. «толстые нити»), хроматиды утолщаются и укорачиваются. Отдельные хроматиды становятся хорошо различимыми под световым микроскопом, может происходить кроссинговер. **Кроссинговер** — обмен генетическим материалом, посредством которого гены одной хроматиды обмениваются на гомологичные гены другой хроматиды. Обмен участками может продолжаться и во время следующей стадии — **диplotены** (в пер. с греч. — двойные нити). Во время диplotены сиnapтонемный комплекс разрушается и гомологичные хромосомы начинают разделяться. Обычно они все-таки остаются соединенными в различных точках, называемых хиазмами; считается, что это те участки, в которых происходил кроссинговер. Стадия диplotены характеризуется высоким уровнем транскрипции генов.

Метафаза I деления мейоза начинается с **диакинеза** (в пер. с греч. — расхождение) хромосом (**рис. 6.19Б**). Ядерная оболочка разрушается, и хромосомы перемещаются, выстраиваясь в метафазную пластинку. Анафаза первого деления мейоза не начинается до тех пор, пока хромосомы не будут выстроены должным образом при помощи нитей веретена деления. Такое выстраивание достигается при помощи белков, предохраняющих циклин Б от разрушения до тех пор, пока все хромосомы не будут надежно прикреплены к микротрубочкам.

Во время анафазы первого деления мейоза гомологичные хромосомы оказываются уже независимыми друг от друга. Эта стадия приводит к телофазе первого деления мейоза, во время которой образуются две дочерние клетки, каждая из которых содержит по одной хромосоме из пары гомологичных X-хромосом. После короткой стадии покоя, известной как **интеркинез**, начинается второе деление мейоза. Во время второго деления мейоза кинетохор каждой хромосомы делится таким образом, что каждая из новых клеток получает одну из двух хроматид, конечный результат — образование четырех гаплоидных клеток. Важно, что во время мейоза происходит перегруппировка хромосом. Каждая из четырех гаплоидных клеток имеет отличный от других набор хромосом. У людей расположение и перемещение мейотических хромосом регулируется кольцевым белковым комплексом когезином, который окружает сестринские 23 пары хромосом. Таким образом, 2²³ (почти 10 млн) различных гаплоидных клеток

¹ Термины «центромера» и «кинетохор» часто используют взаимозаменяемо, но на самом деле кинетохор — белковый комплекс, который собирается на последовательности ДНК, известной как центромера.

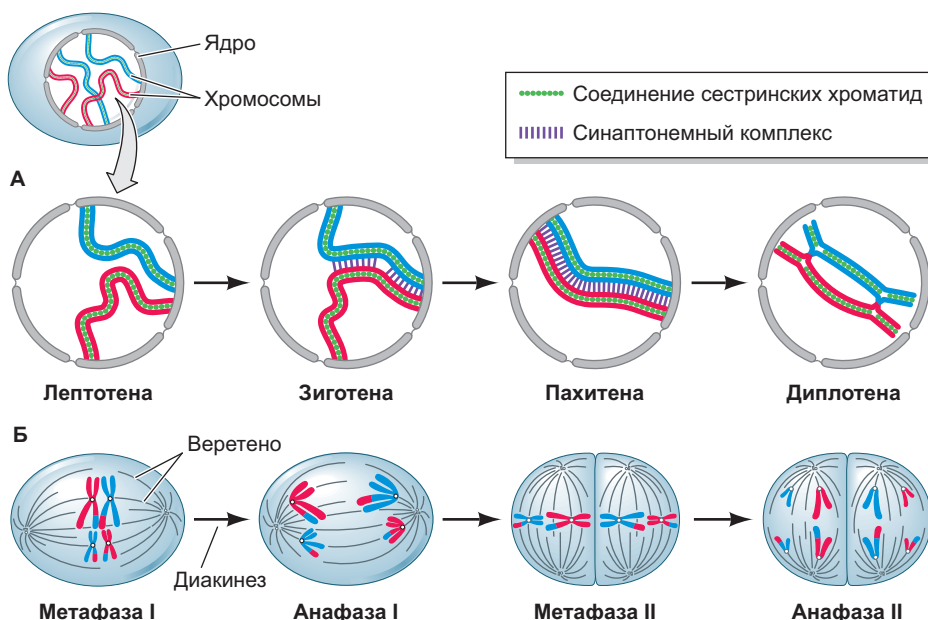


Рис. 6.18. Схема мейоза с акцентом на синаптонемный комплекс. До начала мейоза непарные гомологичные хромосомы случайным образом распределяются внутри ядра. **А.** Четыре этапа профазы I деления мейоза. В лептотене теломеры прикрепляются к ядерной оболочке. Хромосомы «ищут» гомологичные себе хромосомы, синапсис (сопряжение гомологичных хромосом) начинается в зиготене, когда можно обнаружить первые признаки образования синаптонемного комплекса. Во время пахитены по всей длине хромосом наблюдается выравнивание гомологов, что приводит к формированию бивалентов в диплотене. Спаренные гомологи могут обмениваться участками (кроссинговер) во время зиготены, пахитены и даже диплотены. Во время диплотены, когда рекомбинация завершается, синаптонемный комплекс разрушается. **Б.** На стадии диакинеза хромосомы конденсируются и затем выстраиваются в метафазную пластинку. Сегрегация (разделение) гомологичных хромосом происходит в анафазе первого деления мейоза. Только одна пара сестринских хроматид показана здесь на стадии второго деления мейоза. Сестринские хроматиды выравниваются во время метафазы II, а затем во время анафазы II расходятся к противоположным полюсам. (По данным: J. H. Tsai and B. D. McKee, 2011, *J Cell Sci* 124: 1955–1963.)

могут быть сформированы из генома одного человека. Кроме того, кроссинговер, происходящий во время пахитены и диплотены первого деления мейоза, еще больше увеличивает генетическое разнообразие и делает количество потенциально различных гамет неисчислимо большим. Когезин выявляется как в кинетохоре, так и вокруг плеч хроматид (рис. 6.19В). Когезины привлекают белки, которые облегчают спаривание гомологичных хромосом и позволяют происходить рекомбинации (Pelttari et al., 2001; Villeneuve and Hillers, 2001; Sakuno and Watanabe, 2009). В анафазе когезины, окружающие хроматин, разрушаются, что позволяет разделить две хромосомы. Когезины на кинетохоре защищены и не разрушаются (Argunhan et al., 2017; Mihajlović and FitzHarris, 2018). Эти кольца когезина противостоят силам, создаваемым микротрубочками веретена деления, тем самым сохраняя сестринские хроматиды в соединенном состоянии во время первого деления мейоза (Hering et al., 2008; Brar et al., 2009). При втором делении когезины кинетохора расщепляются

и кинетохоры сестринских хроматид могут отделяться друг от друга (Schöckel et al., 2011).

Сперматогенез у млекопитающих

Сперматогенез — путь развития от половых клеток к зрелым сперматозоидам, начинается в период полового созревания и протекает между отростками клеток Сертоли (рис. 6.20). Сперматогенез подразделяется на три основных периода (Matson et al., 2010):

1. Период размножения, во время которого популяция стволовых сперматогонимальных клеток (**сперматогоний**) увеличивается благодаря митотическим делениям.
2. Период, когда происходит мейоз, включающий два последовательных деления, в результате которых образуются гаплоидные клетки.
3. Период «формирования», называемый **спермиогенезом**, наступает после завершения мейоза. Во время этого периода круглые клетки (сперматиды) теряют большую часть цитоплазмы и превращаются в сперматозоиды обтекаемой формы.

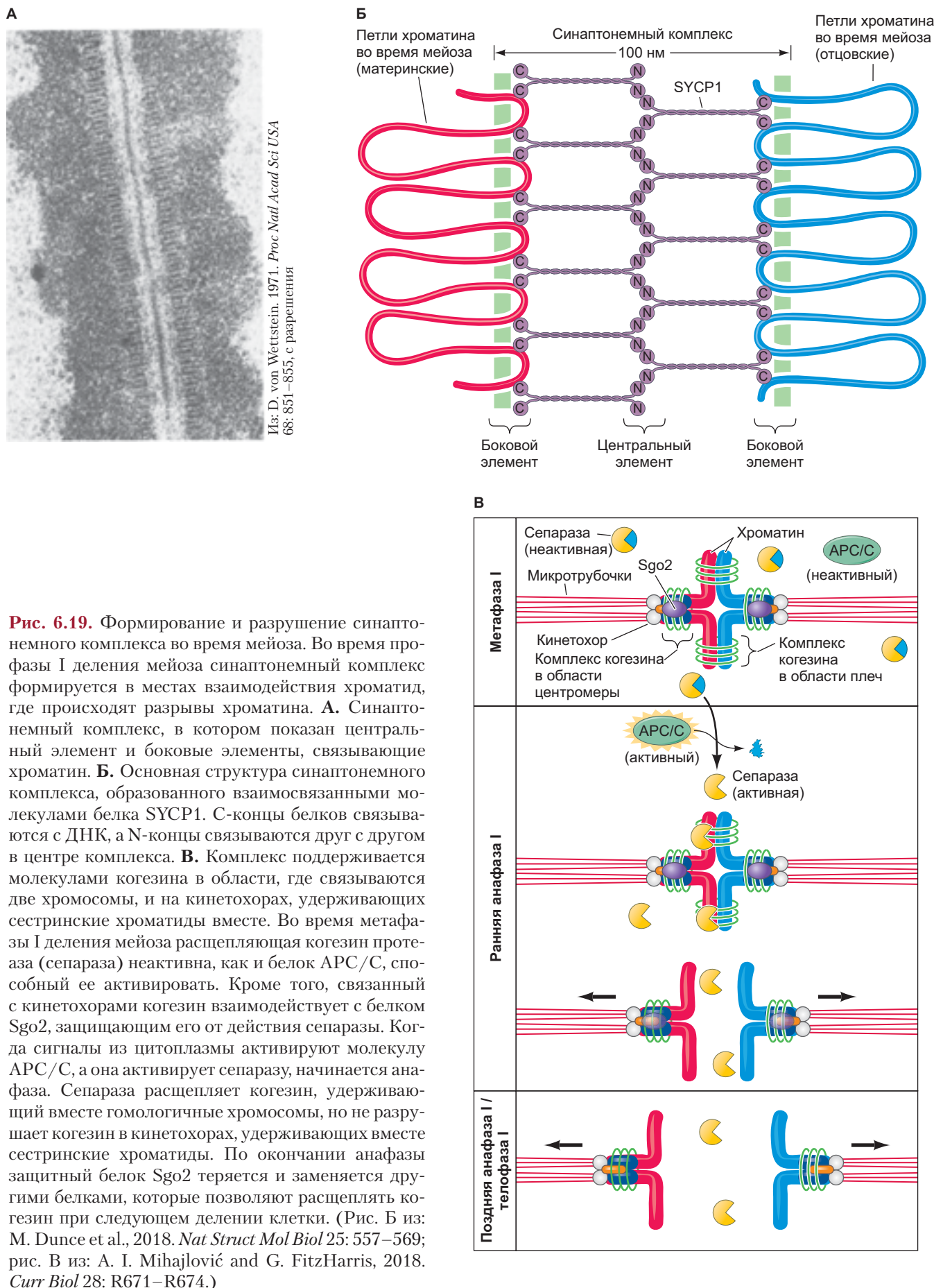


Рис. 6.19. Формирование и разрушение синаптонемного комплекса во время мейоза. Во время профазы I деления мейоза синаптонемный комплекс формируется в местах взаимодействия хроматид, где происходят разрывы хроматина. **А.** Синаптонемный комплекс, в котором показан центральный элемент и боковые элементы, связывающие хроматин. **Б.** Основная структура синаптонемного комплекса, образованного взаимосвязанными молекулами белка SYCP1. С-концы белков связываются с ДНК, а N-концы связываются друг с другом в центре комплекса. **В.** Комплекс поддерживается молекулами когезина в области, где связываются две хромосомы, и на кинетохорах, удерживающих сестринские хроматиды вместе. Во время метафазы I деления мейоза расщепляющая когезин протеаза (сепараза) неактивна, как и белок APC/C, способный ее активировать. Кроме того, связанный с кинетохорами когезин взаимодействует с белком Sgo2, защищающим его от действия сепаразы. Когда сигналы из цитоплазмы активируют молекулу APC/C, а она активирует сепаразу, начинается анафаза. Сепараза расщепляет когезин, удерживающий вместе гомологичные хромосомы, но не разрушает когезин в кинетохорах, удерживающих вместе сестринские хроматиды. По окончании анафазы защитный белок Sgo2 теряется и заменяется другими белками, которые позволяют расщеплять когезин при следующем делении клетки. (Рис. Б из: M. Duncie et al., 2018. *Nat Struct Mol Biol* 25: 557–569; рис. В из: A. I. Mihajlović and G. FitzHarris, 2018. *Curr Biol* 28: R671–R674.)

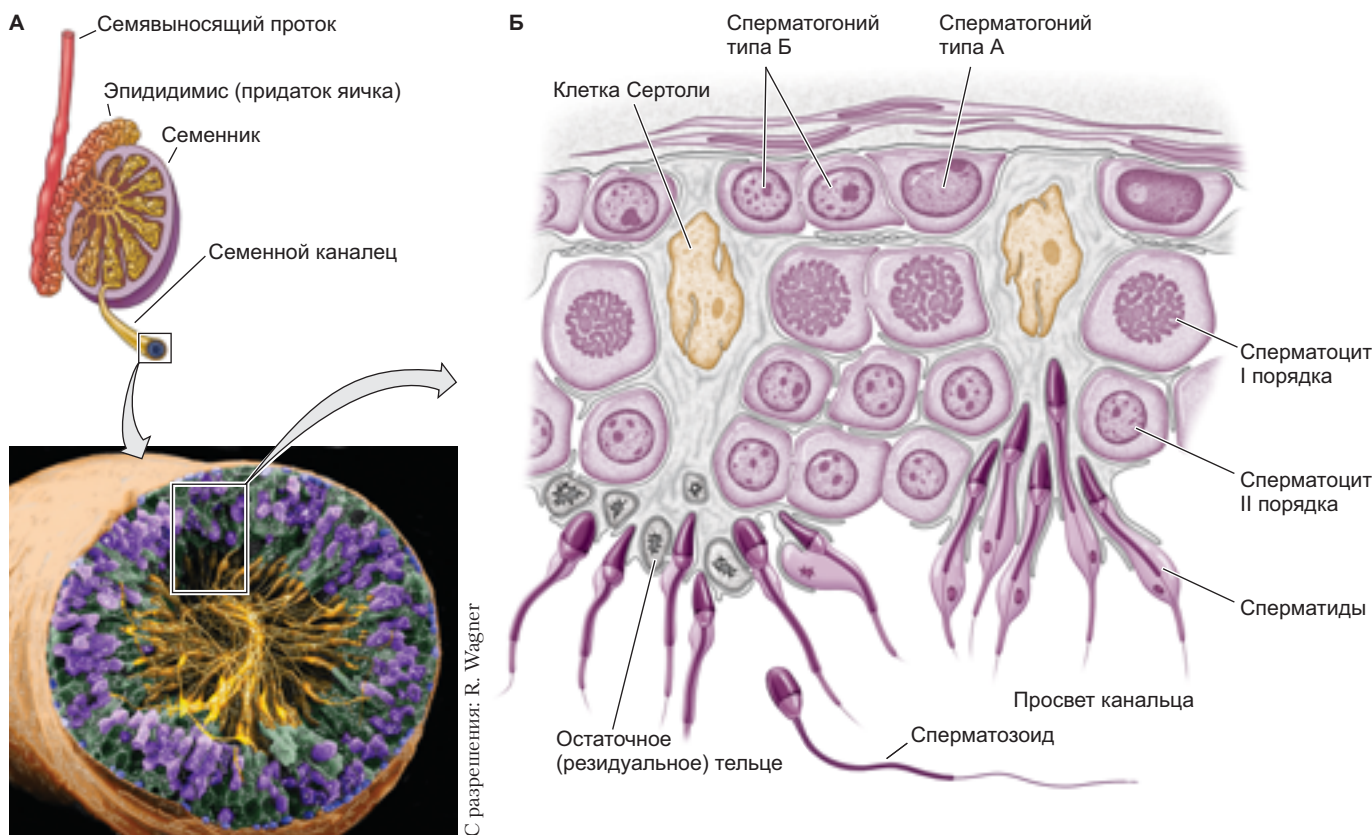


Рис. 6.20. Созревание сперматозоидов. **А.** Поперечный срез семенного канальца. Сперматогонии окрашены в синий цвет, сперматоциты — в бледно-лиловый, а зрелые сперматозоиды — в желтый. **Б.** Упрощенная схема участка семенного канальца, демонстрирующая взаимосвязь между сперматогониями, сперматоцитами и сперматозоидами. По мере созревания клетки перемещаются ближе к просвету семенного канальца (см. также рис. 7.1). (Рис. Б по: M. Dym, 1977. *In Histology*, 4th Ed., L. Weiss and R. O. Greep [Eds.], pp. 979–1038. McGraw-Hill: New York, с разрешения Stephane Clermont.)

Пролиферативная фаза начинается, когда ППК млекопитающих заселяют половой валик эмбриона мужского пола. С этого момента они называются **гоноцитами** и развиваются в составе половых тяжей, которые впоследствии станут семенными канальцами (Culty, 2009). Гоноциты превращаются в недифференцированные сперматогонии, располагающиеся в базальной части канальцев (Yoshida et al., 2007; Yoshida 2016). Это истинные стволовые клетки, так как при пересадке мышам с нарушенным при воздействии токсичных химических веществ сперматогенезом они могут восстанавливать производство сперматозоидов. Сперматогонии, по-видимому, располагаются в нише стволовых клеток на границе между клетками Сертоли (эпителий семенных канальцев), интерстициальными (синтезирующими тестостерон) клетками Лейдига и кровеносными сосудами семенника. Молекулы клеточной адгезии соединяют сперматогонии с клетками Сертоли, выполняющими трофическую функцию (Newton et al., 1993; Pratt et al., 1993; Kanatsu-Shinohara et al., 2008).

Процент гоноцитов, которые становятся настоящими стволовыми клетками, значительно различается между группами млекопитающих, и клетки,

формирующие нишу стволовых клеток, также могут различаться (de Rooij, 2017; Fayomi and Orwig, 2018). Это связано с тем, что у разных групп млекопитающих реализованы различные стратегии производства сперматозоидов. У мышей, например, проходит 12 делений митоза у клеток-предшественников между стадией сперматогонияльных стволовых клеток и сперматоцитов, которые вступают в мейоз. У них образуется 40 млн сперматозоидов на 1 г ткани семенника в сутки. У людей больше стволовых клеток, но проходит всего 5 делений между стадией сперматогонияльных стволовых клеток и сперматоцитов. У мужчины образуется 4,4 млн сперматозоидов на 1 г ткани семенника каждый день. И хотя это в 10 раз менее эффективно, чем у мышей, взрослые мужчины производят более 1000 сперматозоидов в секунду (Matson et al., 2010). Ежедневно в каждом семеннике человека производится 100 млн сперматозоидов, во время эякуляции выходят 200 млн сперматозоидов. Неиспользованная сперма или резорбируется, или выводится из организма с мочой. В течение всей жизни мужчина может произвести от 10^{12} до 10^{13} сперматозоидов (Reijo et al., 1995).

В результате митотической пролиферации стволовых клеток образуются сперматогонии типа А, которые связаны друг с другом цитоплазматическими мостиками. Однако эта связь очень хрупкая, и клетка может отделиться от группы и снова стать стволовой (Hara et al., 2014). Нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF), синтезируемый клетками Сертоли, поддерживает способность стволовых клеток делиться митозом (Chen et al., 2016a). Однако факторы семейства BMP и Wnt начинают индуцировать дифференцировку сперматогоний типа А в сперматогонии (Song and Wilkinson, 2014; Tokue et al., 2017).

МЕЙОТИЧЕСКАЯ ФАЗА: ГАПЛОИДНАЯ СПЕРМАТИДА

Сперматогонии типа Б — предшественники сперматозоидов, отличаются более высоким уровнем экспрессии Stra8 (рис. 6.21; de Rooij and Russell, 2000; Nakagawa, 2010; Griswold et al., 2012). Это последние клетки, которые делятся митозом, и делятся они один раз с образованием **сперматозоидов I порядка** — клеток, которые будут делиться мейозом. Каждый сперматозоид I порядка в результате первого деления мейоза дает пару гаплоидных **сперматозоидов**

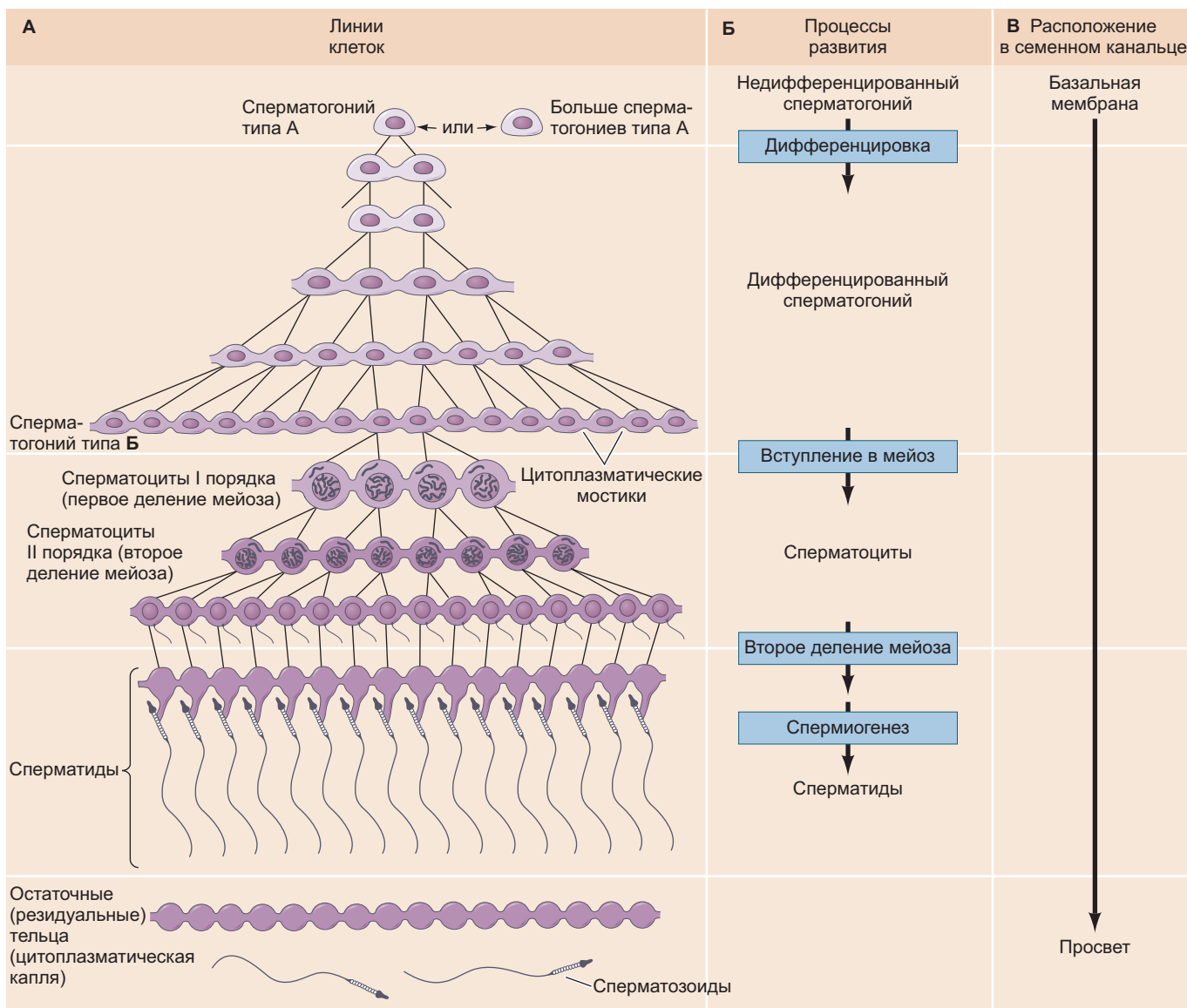


Рис. 6.21. Описание сперматогенеза. **А.** Формирование синцитиальных клонов (дочерние клетки, цитоплазма которых не полностью разделена) мужских половых клеток млекопитающих. У мышей может быть 16 сперматогониев типа Б, соединенных вместе. У человека, вероятно, цитоплазматическими мостиками соединены только 4 клетки. **Б.** Основные типы клеток при сперматогенезе и основные события, которые с ними происходят по мере развития. **В.** Клетки перемещаются от базальной мембраны к просвету семенного канальца по мере развития. (Рис. А по: M. Dym and D. W. Fawcett, 1971. *Biol Reprod* 4: 195–215; рис. Б, В по: D. G. de Rooij, 2017. *Development* 144: 3022–3030.)

II порядка, завершающих второе деление мейоза. Образованные в результате второго деления мейоза клетки называются **сперматидами**, они все еще связаны между собой цитоплазматическими мостиками. Сперматиды, связанные таким образом, имеют гаплоидные ядра, но функционально диплоидны, так как продукты работы генов, полученные в одной клетке, могут легко диффундировать в цитоплазму соседних клеток (Braun et al., 1989).

По мере деления при превращении из недифференцированных сперматогоний в сперматиды клетки перемещаются от базальной мембраны семенного канальца к его просвету (см. рис. 6.20; Siu and Cheng, 2004).

ПОСТМЕЙОТИЧЕСКАЯ ФАЗА: СПЕРМИОГЕНЕЗ

По мере продвижения сперматид к просвету канальца они теряют связь друг с другом и превращаются в сперматозоиды. Данный процесс носит название **спермиогенеза**. У человека превращение сперматогонимальных стволовых клеток в зрелые сперматозоиды занимает 65 дней (Дум, 1994), а треть этого времени (около 21 дня) приходится на спермиогенез. Гаплоидные сперматиды млекопитающих округлые, лишённые жгутиков клетки, совсем не похожи на зрелые сперматозоиды позвоночных. Для того чтобы произошло оплодотворение, сперматозоид должен встретиться и провзаимодействовать с яйцеклеткой; в ходе спермиогенеза сперматозоиды приобретают способность к такому взаимодействию и активному движению. Процесс дифференцировки сперматозоидов млекопитающих показан на рис. 7.1 и будет описан в следующей главе.

Оогенез у млекопитающих

Ученые, изучающие оогенез, часто с удивлением отмечают, что предстоит решить еще много вопросов, связанных с этим процессом. Оогенез млекопитающих (производство яйцеклеток) сильно отличается от сперматогенеза. Яйцеклетки созревают благодаря стройной координации действия гормонов, паракринных факторов, ферментов, структур хроматина и анатомии тканей. Созревание яйцеклеток млекопитающих включает четыре периода. Во-первых, период пролиферации. В эмбрионе человека около 1000 ППК достигают развивающегося яичника и быстро делятся во время второго—седьмого месяца внутриутробного развития. В результате образуется около 7 млн оогоний (рис. 6.22). В то время как большая часть оогоний вскоре погибает, выжившая популяция под влиянием ретиноевой кислоты вступает в следующий период и приступает к мейозу. Клетки становятся первичными ооцитами (**ооцитами I порядка**). Первое деление мейоза не доходит до конца, ооциты I порядка останавливаются на стадии диплотены

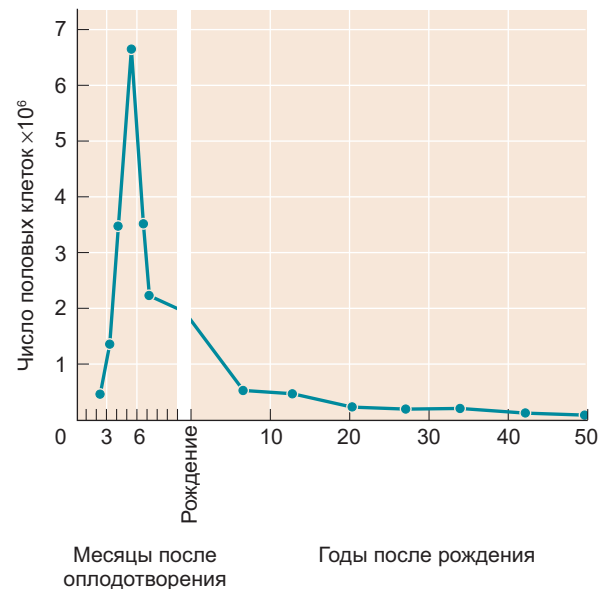
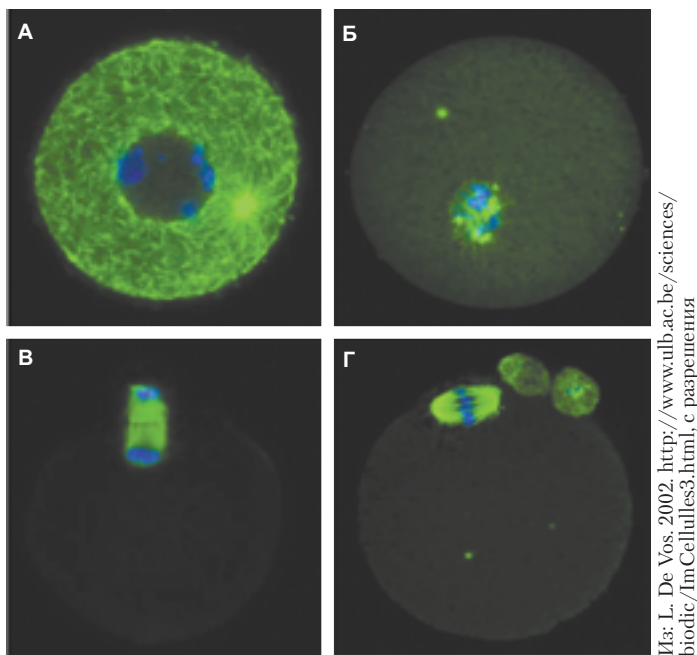


Рис. 6.22. Число половых клеток в яичнике человека меняется в течение жизни. (Из: Т. G. Baker, 1971. *Am J Obstet Gynecol* 110: 746–761, по данным Т. G. Baker and S. Zuckerman, 1963. *Proc R Soc Lond* 158: 417–433; и E. Block, 1952. *Acta Anat* 14: 108–123.)

профазы первого деления мейоза (Pinkerton et al., 1961). Эту длительную стадию диплотены иногда называют стадией **диктиотены**, она может длиться от 12 до 40 лет. С наступлением периода полового созревания группы ооцитов периодически возобновляют деления мейоза. В то же время **лютеинизирующий гормон** (ЛГ), выделяемый гипофизом, снимает этот блок и позволяет ооцитам продолжить мейоз (Lomniczi et al., 2013; Tiwari and Chaube, 2017). Они завершают первое деление мейоза и превращаются во вторичные ооциты (**ооциты II порядка**), которые приступают ко второму делению мейоза и проходят созревание. Созревание включает в себя перекрестное действие паракринных факторов, выделяемых как ооцитом, так и фолликулярными клетками, которые созревают в течение этой фазы. Фолликулярные клетки запускают трансляцию запасенных в ооците мРНК. Эти мРНК кодируют, например, белки, связывающие сперматозоиды, необходимые при оплодотворении, и циклины, регулирующие деление клеток эмбриона (Chen et al., 2013; Cakmak et al., 2016). После того как ооцит II порядка выходит из яичника, возобновление мейоза произойдет только после оплодотворения. При оплодотворении ионы кальция высвобождаются из внутриклеточного депо и снимают блок мейоза, что позволяет сформироваться гаплоидному ядру.

МЕЙОЗ ВО ВРЕМЯ ООГЕНЕЗА

Согласно обзорной статье Severance и Latham (2018), посвященной оогенезу, ооцит — замечательная



Из: L. De Vos, 2002, <http://www.uilb.ac.be/sciences/biodic/ImCellules3.html>, с разрешения

Рис. 6.23. Мейоз в ооцитах мыши. Тубулин микротрубочек окрашен зеленым, ДНК окрашена синим. **А.** Ооцит мыши на стадии профазы мейоза. Большое диплоидное ядро (зародышевый пузырек) интактно, в нем идет транскрипция генов, мРНК которых будет запасена в ооците как материнская мРНК. **Б.** Ядерная оболочка зародышевого пузырька разрушается с началом метафазы. **В.** Анафаза I деления мейоза, во время которой веретено деления перемещается на периферию ооцита и образуется первое полярное тельце. **Г.** Метафаза II деления мейоза, во время которой отделяется второе полярное тельце (первое полярное тельце тоже делится)

клетка, выполняющая две универсальные функции в размножении: правильного разделения хромосом во время двух последовательных делений мейоза и обеспечения жизнеспособности раннего эмбриона до активации транскрипции. Чтобы обеспечить выживание эмбриона до активации собственного генома в его клетках, ооциты достигают больших размеров, а делятся таким образом, чтобы минимизировать потерю цитоплазмы. В то время как сперматозоиды теряют цитоплазму, яйцеклетка ее накапливает.

У млекопитающих мейоз во время оогенеза во многом отличается от мейоза во время сперматогенеза. Во-первых, при делении ооцитов I порядка разрушается их ядерная оболочка, а веретено деления смещается в кортекс (на периферию) клетки (Severson et al., 2016). В кортексе специфичный для ооцита тубулин способствует разделению хромосом. Было обнаружено, что мутации в тубулине вызывают бесплодие (Feng et al., 2016). Во время телофазы, когда обе дочерние клетки содержат гаплоидное ядро, одной достается практически вся цитоплазма, а второй лишь незначительное количество (**рис. 6.23**). Клетка меньшего размера становится **первым полярным тельцем**, а более крупная — ооцитом II порядка.

Такой асимметричный цитокинез регулируется цитоскелетом, в первую очередь актиновыми филаментами, удерживающими веретено деления и смещающими его в кортекс ооцита посредством миозин-опосредованного сокращения (Schuh and Ellenberg, 2008). Подобный неравномерный цитокинез имеет место и при втором делении мейоза. Большая часть цитоплазмы достается зрелой **яйцеклетке**, и формируется **второе полярное тельце**. (У человека первое полярное тельце обычно не делится. Оно подвергается апоптозу примерно через 20 ч после первого деления мейоза.) Таким образом, при мейозе во вре-

мя оогенеза весь объем цитоплазмы достается одной клетке, а не разделяется поровну между четырьмя клетками (Longo, 1997; Schmerler and Wessel, 2011).

Второе отличие мейоза во время оогенеза от мейоза во время сперматогенеза заключается в механике процесса. В веретене деления ооцита во время мейоза отсутствуют центриоли. Микротрубочки веретена деления организуются при помощи мРНК и ферментов, расположенных на хромосомах и самих нитях веретена (Severson et al., 2016; Severance and Latham, 2018). Вместо двух центриолей во время профазы I деления мейоза вокруг ядерной оболочки формируются множественные **центры организации микротрубочек (ЦОМТ)**. ЦОМТ объединяются на будущих полюсах веретена, когда ядерная оболочка разрушается.

ООЦИТЫ И ВОЗРАСТ

Задержка яйцеклетки в яичнике на протяжении десятилетий имеет серьезные медицинские последствия. Большая часть эмбрионов человека не доживает до рождения. Существенная доля, вероятно, даже большинство оплодотворенных яйцеклеток человека содержит либо избыточное, либо недостаточное для выживания число хромосом. Генетический анализ показал, что **анеуплоидия** (неверное число хромосом) обычно обусловлена ошибками, произошедшими во время мейотических делений ооцита (Hassold et al., 1984; Munné et al., 2007). Только несколько анеуплоидий (например, по половым хромосомам и по 21-й хромосоме) совместимы с жизнью, и процент детей с такими нарушениями значительно увеличивается с возрастом матери. У женщин в возрасте 20 лет с вероятностью 2–3% может родиться ребенок,

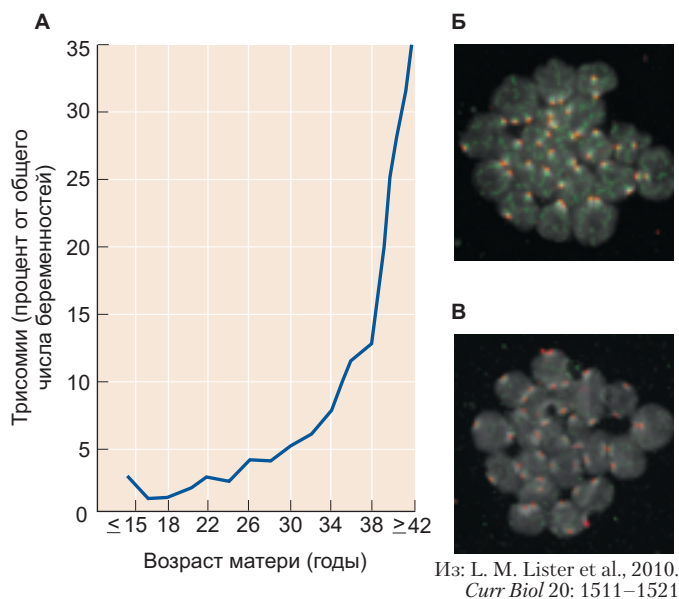


Рис. 6.24. Нерасхождение хромосом и мейоз. **А.** Возраст матери влияет на частоту возникновения трисомии во время беременности. **Б, В.** Уменьшение количества когезинов, связанных с хромосомами, у старых мышей. ДНК (показано белым) и когезин (показано зеленым), окрашенные в ядрах ооцитов (**Б**) двухмесячных (молодых) и (**В**) 14-месячных (старых) мышей. У старых мышей существенно снижено количество когезина (особенно в области кинетохора). (Рис. А по: P. Hunt and T. Hassold, 2010. *Curr Biol* 20: R699–R702.)

в клетках которого содержится дополнительная хромосома. У женщин, которые забеременели в возрасте 40 лет, такой риск составляет 35% (рис. 6.24А; Hassold and Chiu, 1985; Hunt and Hassold, 2010). Причины этого явления, по-видимому, кроются в потере когезинов по мере старения клеток (рис. 6.24Б, В; Chiang et al., 2010; Lister et al., 2010; Revenkova et al., 2010), что приводит к менее стабильной связи между кинетохором и веретеном деления (Holubcová et al., 2015).

Определение пола и гаметогенез у покрытосеменных растений

Определение пола

Когда вы думаете о цветах, вы в действительности думаете о половых органах покрытосеменных (цветковых) растений. Примечательно, что у большинства покрытосеменных отдельные особи не принадлежат к одному полу. Точнее, однодомное растение может иметь как мужские, так и женские (однополые) или же обоеполые цветки. Обоеполые, или «совершенные», цветки имеют как определенные мужские органы (тычинки), так и женские (пестик)¹.

Части растения, предназначенные для того, чтобы стать цветками, определяет экспрессия генов в апикальной меристеме побега, которая превращает ее в меристему соцветия. В свою очередь, меристема соцветия при активации экспрессии других генов формирует меристему цветка, из которой цветок и будет развиваться. Этот каскад экспрессии генов находится под контролем как внутренних факторов, так и факторов окружающей среды, важнейший

из них — фотопериод, который подавляет экспрессию генов, связанных с пролиферацией меристемы, активируя те, которые участвуют с формированием органов размножения.

У модельного растения *Arabidopsis thaliana* цветение запускает активация гена *CONSTANS (CO)*. Транскрипционный фактор, кодируемый этим геном, связан с циркадианным (суточным) ритмом и достигает максимальной концентрации во второй половине дня. Однако данный белок стабилен только на свету, поэтому он функционален только в длинные летние дни, когда светло, по крайней мере, в течение 12 ч после рассвета (Valverde et al., 2002; Yanovsky and Kay, 2002; Mizoguchi et al., 2005). Белок CO активирует ген *FLOWERING LOCUS T (FT)*, что приводит к синтезу белка FT в листьях. Белок FT по флоэме поступает в апикальную меристему побега, где образует комплекс с белком *FLOWERING LOCUS D (FD)*, чтобы связаться с ДНК и работать как транскрипционный фактор (Notaguchi et al.,

¹ У растений есть пол. Данный факт был неизвестен в Европе до тех пор, пока Рудольф Камерриус не показал это в 1649 г. Однако древние вавилоняне в 4 в. до н. э. не только знали, что у растений есть половая принадлежность, но и использовали это знание в сельском хозяйстве. Например, инжир — один из представителей покрытосеменных растений, у которого мужские и женские органы образуются на разных растениях. Так как у инжира плодоносили только женские деревья, фермеры сажали несколько мужских деревьев, а потом вручную опыляли множество женских. Такой подход существенно повысил показатель урожайности, а опыления стали приурочивать к весенним праздникам плодородия (Roberts, 1929). Эразм Дарвин (утверждавший, что половое размножение — «чудо природы») написал учебник по таксономии в форме рифмованных (и часто эротических) куплетов, в которых сравнивал тычинки с мужчинами, а плодолостики с женщинами.

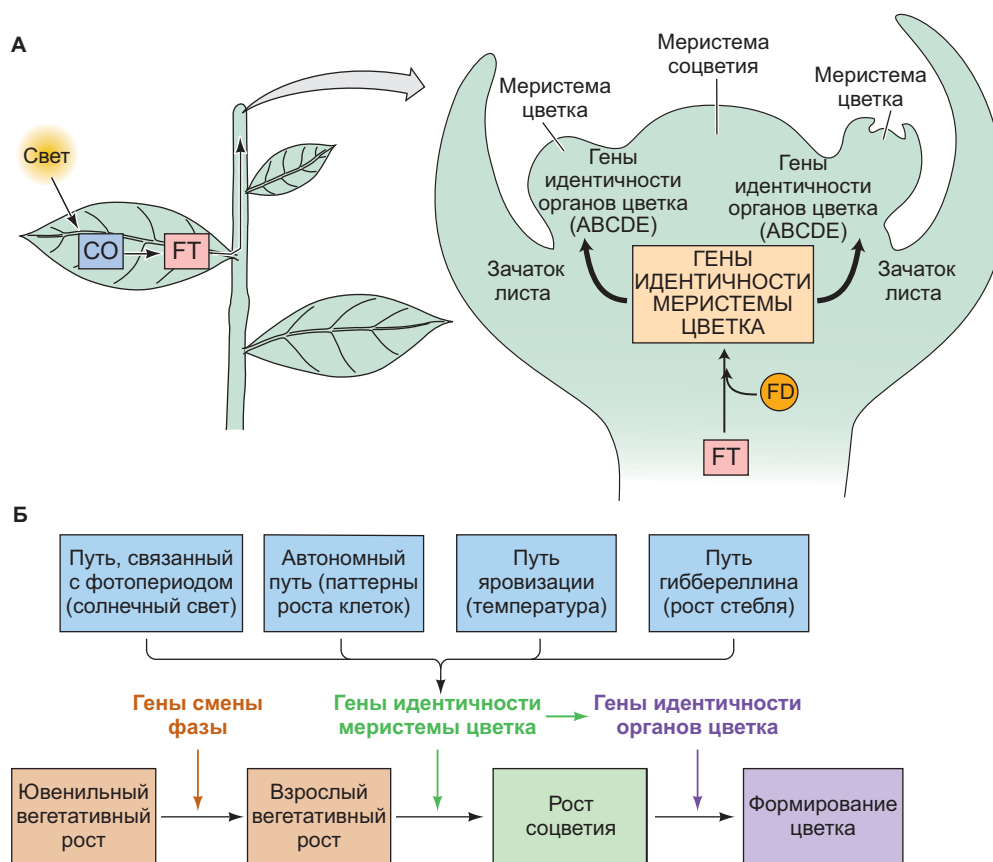


Рис. 6.25. Переход от вегетации к репродукции. **А.** CO активирует FT, который по флоэме перемещается от листьев к апикальной меристеме побега, где образует комплекс с FD. В апикальной меристеме транскрипционный фактор FD/FT активирует гены идентичности меристемы цветка, такие как *LEAFY* и *APETALA1*. Гены идентичности меристемы цветка активируют гены идентичности органов цветка (ABCDE), которые кодируют субъединицы транскрипционных факторов, определяющих части цветка. **Б.** Внутренние и внешние факторы, регулирующие развитие вегетативных или репродуктивных органов из меристемы. Показанные регуляторные механизмы реализуются не у всех видов растений, некоторые виды цветут независимо от сигналов, поступающих из окружающей среды

2008). Комплекс FT/FD активирует **гены идентичности меристемы цветка**, например *APETALA1* (*AP1*), *LEAFY* (*LFY*), *AGAMOUS* (*AG*) и *PISTILLATA* (*PI*) (рис. 6.25; см. также рис. 6.26; Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005).

Следующим шагом является специализация отдельных областей меристемы цветка для развития определенных его частей. В идеальном цветке вокруг центральной оси находятся четыре полных круга заложения органов цветка. Первый (внешний) круг становится **чашелистиками**, поддерживающими и защищающими цветков. Второй — **лепестками**, которые часто ярко окрашены для привлечения опылителей. Третий круг становится мужскими органами, **тычинками**, в то время как четвертый (центральный) — **пестиками** — женскими органами, включающими рыльце, столбик и семязачаток, который формируется у основания столбика (рис. 6.26; Meyerowitz et al., 1989; Schwarz-Sommer et al., 1990;

Coen and Meyerowitz, 1991; Theissen et al., 2016). Сравнительные генетические исследования видов растений позволили создать модель ABCDE, которая описывает регуляцию образования органов цветка (Meyerowitz et al., 1989; Theissen, 2001; Theissen et al., 2016).

В модели ABCDE органы цветка определены пятью белками, которые объединены в тетрамеры, специфичные для определенного органа. Белки и **гены идентичности органов цветка**, кодирующие эти белки, сгруппированы в классы A, B, C, D и E. Ключевая особенность модели в том, что гены и белки, относящиеся к этим классам, по-разному экспрессируются в четырех кругах заложения органов цветка (рис. 6.27).

Белки класса E необходимы для полноценного функционирования остальных белков во время образования органов цветка. Похоже, что их кодируют гены идентичности органов цветка, упомянутые

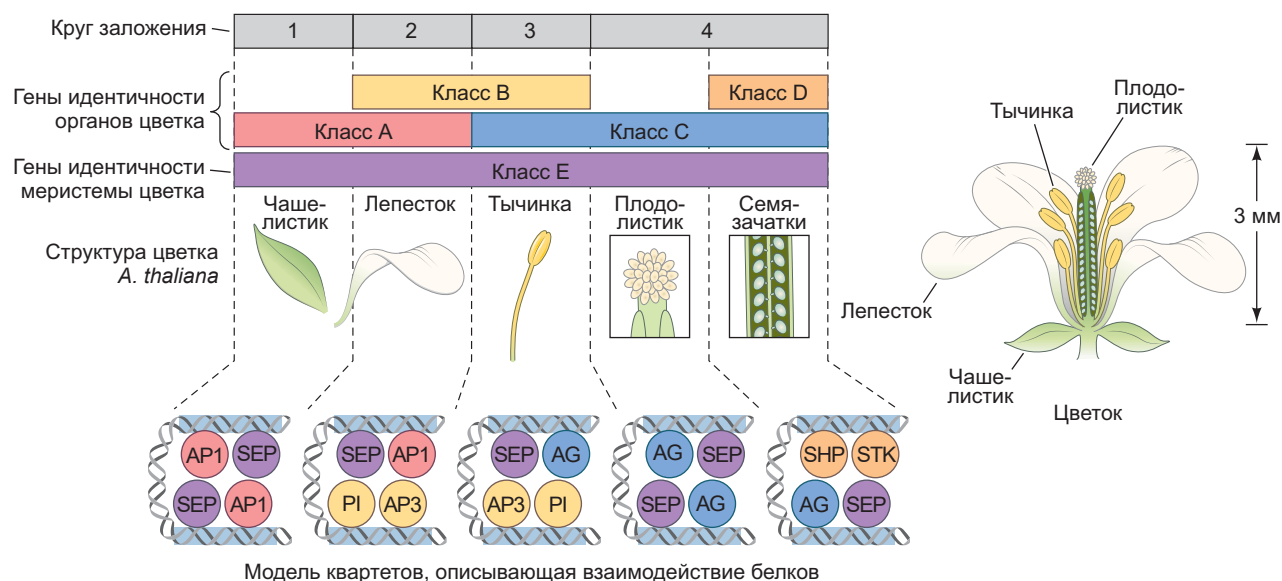


Рис. 6.26. Модель квартетов и лежащая в ее основе ABCDE-модель определения идентичности органов у *Arabidopsis thaliana*. В нижней части рисунка представлена модель квартетов, согласно которой пять органов цветка (чашелистики, лепестки, тычинки, плодолистики и семязачатки) определены образованием тетрамерных комплексов транскрипционных факторов MADS-доменов, специфичных для отдельных органов, которые связываются с двумя соседними энхансерами (фиолетовый), формируя петлю ДНК (голубая) между ними. Комплекс, состоящий из двух белков класса А (таких как APETALA 1 [AP1]) и двух белков класса Е (таких как SEPALLATA [SEP]), определяют формирование чашелистиков. Комплекс из одного белка класса А, одного белка класса Е и одного из белков класса В (таких как APETALA 3 [AP3] и PISTILLATA [PI]) отвечает за формирование лепестков. Комплекс из одного белка класса Е, двух белков класса В и одного белка класса С (например, AGAMOUS [AG]) определяет идентичность тычинок, в то время как комплекс из двух белков класса Е и двух белков класса С определяет плодолистики. Комплекс из одного белка класса Е, одного белка класса С и одного из белков класса D (SHATTER-PROOF [SHP] и SEEDSTICK [STK]) отвечает за развитие семязачатков. В верхней части рисунка представлена модель ABCDE, согласно которой спецификация органов цветка *A. thaliana* контролируется пятью наборами гомеозисных генов. Гены класса А экспрессируются в первом и втором кругах закладки органов цветка, гены класса В — во втором и третьем кругах, гены класса С — в третьем и четвертом кругах, гены класса D — в частях четвертого круга (закладка семязачатка), а гены класса Е экспрессируются во всех четырех кругах. Гены классов А и Е необходимы для развития чашелистиков из первого круга, гены классов А, В и С определяют развитие лепестков, гены классов В, С и Е — тычинок, гены класса С и Е регулируют развитие плодолистиков, а гены классов С, D и Е необходимы для развития семязачатков внутри пестиков. (По данным: Theissen et al., 2016. *Development* 143: 3259–3271; B. A. Krizek and J. C. Fletcher, 2005. *Nat Rev Genet* 6: 688–698.)

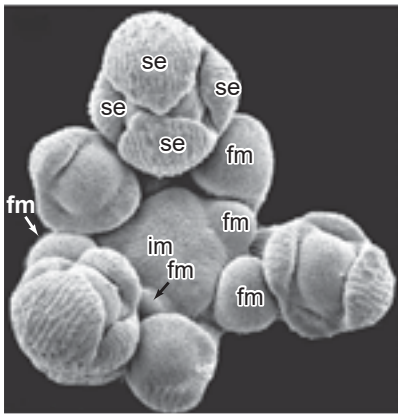
выше. Белки класса А необходимы для образования чашелистиков и лепестков (части цветка, не являющиеся репродуктивными органами); для формирования репродуктивных органов (тычинок, пестиков и семязачатков) необходимы белки класса С. Формирование других частей цветка обусловлено различной комбинацией белков (рис. 6.26). Сочетание белков классов В, С и Е приводит к образованию тычинок; белков класса D, С и Е — семязачатков, а если белки классов С и Е представлены в одиночку, то образуют плодолистики. Сочетание активности генов класса В в присутствии активных генов классов А и Е приводит к развитию лепестков.

Специфичные белки А, В, С, D и Е, экспрессирующиеся в каждой области, собираются вместе и формируют тетрамерные (четырёхчленные) белки, которые действуют как факторы транскрипции, активируя гены, ответственные за формирование конкретных органов (рис. 6.26 и 6.27).

Так, белки, активирующие гены, ответственные за формирование чашелистиков, относят к белкам класса А и Е. Белки, активирующие гены, необходимые для развития тычинок, относят к классам В, С и Е.

Каждая из субъединиц тетрамерного белка может взаимодействовать с ДНК, а также может свора-

А



По данным: B. A. Krizek. 2015. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. <http://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000734.pub3>

Б

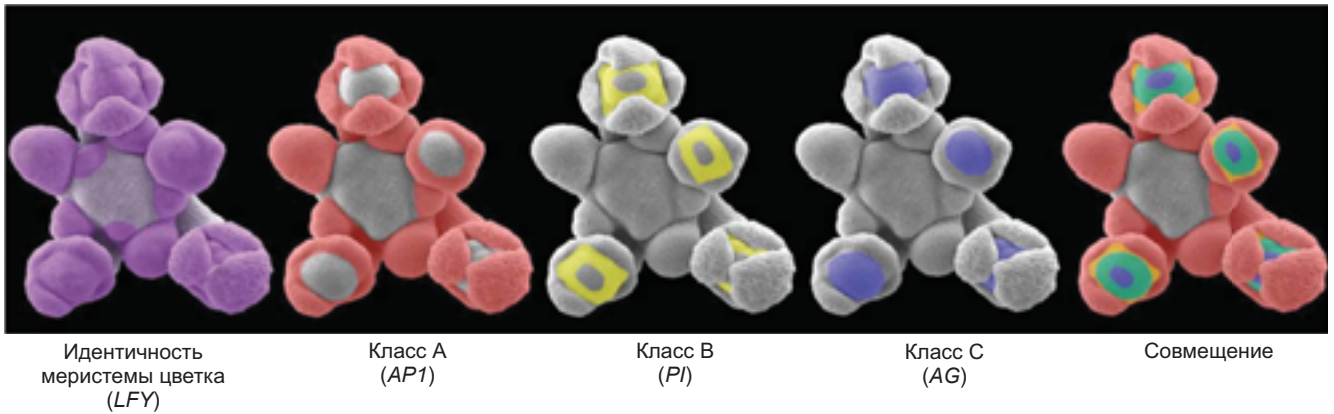


Рис. 6.27. Спецификация меристемы цветка. **А.** Микрофотография меристемы соцветия (im) и ранней меристемы цветка (fm) со сканирующего электронного микроскопа. Четыре зачатка чашелистика (se) развились из более старых участков меристемы цветка и указаны на одном цветке. **Б.** Паттерн экспрессии генов идентичности меристемы цветка и генов идентичности органов цветка. Ген *LFY*, определяющий идентичность меристемы цветка (фиолетовый), экспрессируется в меристеме соцветия, меристеме цветка и молодых развивающихся цветках¹. Ген *AP1* (красный), принадлежащий к классу А, экспрессируется в меристеме цветка, развивающихся чашелистиках и лепестках (первом и втором кругах заложения органов) а также в цветоножке. Гены *AP3* и *PI* (желтые), принадлежащие к классу В, экспрессируются во втором и третьем кругах, из которых развиваются лепестки и тычинки. На обложке книги представлен паттерн транскрипции гена *AP3* на этой стадии. Ген *AG* (синий), относящийся к классу С, экспрессируется в третьем и четвертом кругах, из которых развиваются тычинки и плодолистики. Крайняя правая панель показывает совмещение всех генов: в первом круге экспрессируются гены класса А (красные), во втором — гены класса А и В (оранжевые), в третьем — гены класса В и С (зеленые), в четвертом — гены класса С (синие)

чивать ДНК, связываясь с расположенными рядом энхансерами.

Последующая дифференцировка частей цветка проходит под действием многочисленных гормонов, а также под влиянием сезонных факторов окружающей среды (Song et al., 2013). У двудомных растений (таких как дуб и шпинат, у которых есть отдельно как мужские, так и женские растения) паттерн изменен. Например, у шпината мы наблюдаем высокий уровень экспрессии генов идентичности цветка класса В, характерный для третьего круга мужского растения, из которого формируются пыльники, тогда как в женских растениях экспрессия этих генов подавлена (Pfent et al., 2005).

Гаметогенез

В отличие от *Drosophila* и млекопитающих, которые быстро обособляют линию половых клеток от соматических, половые клетки растений не выделяются на ранних этапах развития². Растительные половые

¹ В то время как линия половых клеток у *Drosophila* и млекопитающих обособляется достаточно рано, у многих других видов животных (практически у всех беспозвоночных, включая многих насекомых) линия половых клеток выделяется гораздо позже и берет начало от соматических клеток.

² В соответствии с международным соглашением названия генов растений пишут прописными буквами.

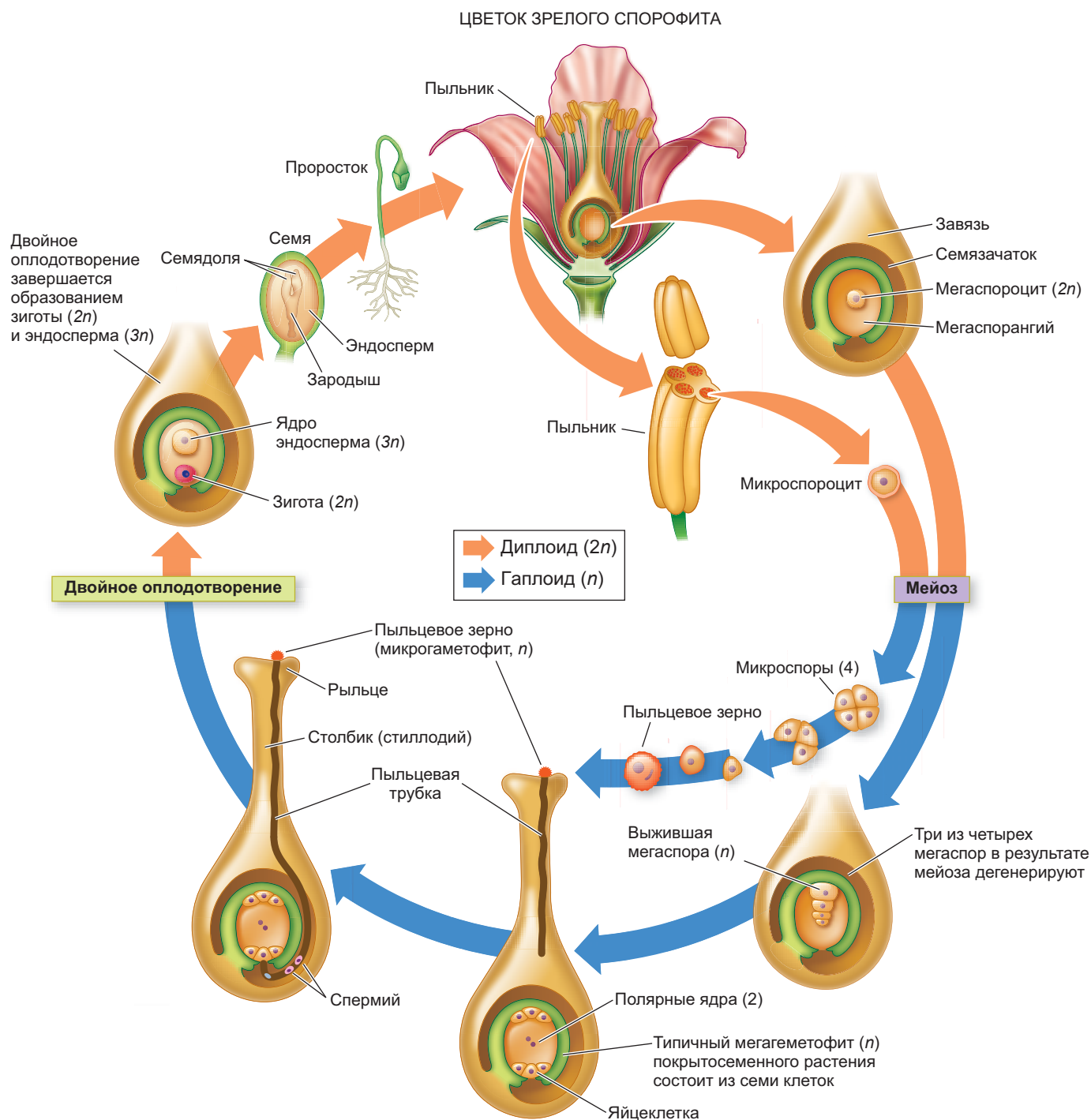


Рис. 6.28. Жизненный цикл покрытосеменного растения. Спорофит — доминирующее поколение, многоклеточные мужские и женские гаметофиты образуются внутри цветков спорофита. Клетки микроспорангия внутри пыльника делятся мейозом с образованием микроспор. Последующие митотические деления ограничены, но конечным результатом является многоклеточное пыльцевое зерно. Интегументы и стенка завязи защищают мегаспорангий. Внутри мегаспорангия в результате мейоза образуются четыре мегаспоры — три мелкие и одна крупная. Только большая мегаспора выживет и даст начало женскому гаметофиту (зародышевому мешку). Когда мужской гаметофит (пыльца) прорастает и пыльцевая трубка растет по направлению к зародышевому мешку, происходит оплодотворение. Новое поколение спорофита может долго сохраняться в состоянии покоя, будучи защищенным семенной кожурой

клетки (как и у ряда беспозвоночных) образуются из диплоидных соматических клеток на поздних стадиях развития. Любая клетка меристемы потенциально половая. Важно помнить, что у растений может происходить и смена поколений. Одно лишь покрытосемянное растение, как мы видим, сочетает в себе то, что принадлежало бы двум растениям у мхов и папоротников (**рис. 6.28**). Спорофит — основная диплоидная часть, которую мы обычно и называем растением. Однако внутри диплоидного цветка образуется второе поколение — гаметофит. Некоторые диплоидные клетки меристемы подвергаются мейозу, в результате чего формируются гаплоидные споры. Споры делятся митозом, чтобы образовать гаплоидный гаметофит. В цветке формируются как мужские, так и женские гаметофиты. Некоторые клетки микроспорангия в пыльниках тычинки претерпевают мейоз и формируют **микроспоры**. Затем эти споры делятся митозом с образованием пыльцевых зерен, которые обычно содержат по два гаплоидных сперматозоида (спермия). Таким образом, в отличие от животных, растительные гаплоидные клетки делятся митозом, чтобы образовались мужские половые клетки. Женский гаметофит, **зародышевый мешок**, развивается внутри семязачатка. Мегаспорангий подвергается мейозу, образуются гаплоидные **мегаспоры**, одна из которых выживает и дает начало зародышевому мешку. Семиклеточный зародышевый мешок содержит женские гаметы (яйцеклетки), а также центральные клетки и вспомогательные (синергиды и антиподы). Мужские и женские гаметы (два спермия, один из которых сливается с яйцеклеткой, а другой — с центральной клеткой) соединяются при оплодотворении, образуя зиготу — первую клетку спорофита нового поколения.

Пыльца

Тычинки содержат четыре группы клеток, называемые **микроспорангиями** (пыльцевые мешки), внутри пыльника. Микроспорангии производят микроспороциты, представляющие собой клетки, которые будут делиться мейозом с образованием микроспор, **пыльцевых зерен** (**рис. 6.27** и **6.28**). Внутренняя стенка пыльцевого мешка обеспечивает питание развивающейся пыльцы. Пыльцевое зерно — чрезвычайно просто устроенная многоклеточная структура. Наружная стенка пыльцевого зерна (**экзина**) часто причудливого строения, состоит из прочного материала, синтезируемого и пыльником (спорофит), и микроспорой (гаметофит). Внутренняя стенка (**интина**) откладывается микроспорами. Зрелое пыльцевое зерно состоит из двух клеток, расположенных одна в другой (**рис. 6.29**). Внутри **пыльцевой трубки** содержится **генеративная клетка**, которая делится с образованием двух спермиев. Ядро пыльцевой трубки управляет прорастанием пыльцы и ростом собственно пыльцевой трубки после того, как пыльцевое зерно попадает на рыльце женского гаметофита. Один из двух спермиев сольется с яйцеклеткой, чтобы произвести следующее поколение спорофита. Другой спермий будет принимать участие в формировании эндосперма — структуры, которая обеспечивает питание зародыша.

Семязачаток

Из четвертого круга заложения цветка формируется плодolistик, который дает начало женскому гаметофиту. Плодolistик состоит из **рыльца**

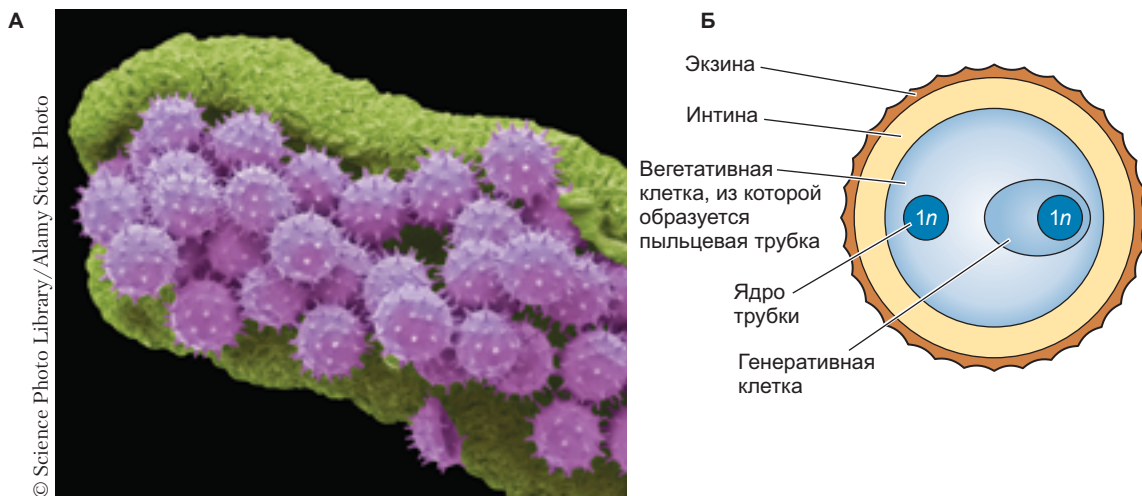


Рис. 6.29. А. Микрофотография пыльцы астры, полученная на электронном сканирующем микроскопе, показывает сложную структуру поверхности пыльцевых зерен. Б. Пыльцевое зерно содержит клетку внутри клетки. Генеративная клетка подвергается делению с образованием двух спермиев. Один спермий оплодотворяет яйцеклетку, а другой сливается с полярными ядрами, формируя эндосперму

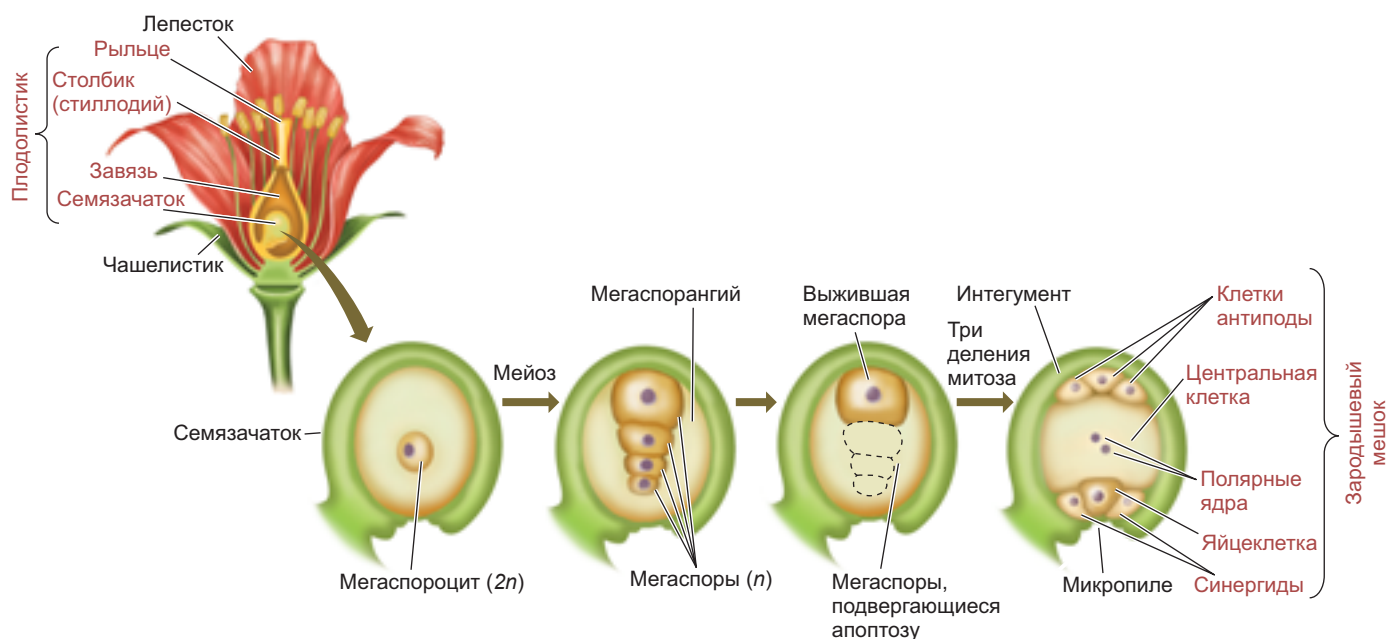


Рис. 6.30. Плодолистик состоит из рыльца, столбика (стилодия) и завязи, содержащей один или более семязачатков. Каждый семязачаток содержит мегаспорангий, защищенный двумя слоями интегумента (покровных клеток). Мегаспороцит делится митозом с образованием гаплоидных мегаспор. Все клетки плодolistика диплоидны за исключением мегаспор, которые делятся митозом и образуют зародышевый мешок (женский гаметофит). Зародышевый мешок — результат трех делений митоза, которые претерпевает гаплоидная мегаспора. Он состоит из семи клеток и восьми гаплоидных ядер. Два полярных ядра в центральной клетке будут сливаться с ядром второго спермия и формировать эндосперм, который будет питать зародыш во время прорастания. Остальные шесть клеток, включая яйцеклетку, содержат по одному гаплоидному ядру

(на него попадает пыльца), **столбика** (стилодия) и **завязи** (см. рис. 6.28). После оплодотворения стенка завязи будет развиваться в **плод**. Таким образом, плод — это созревшая завязь растения, уникальная структура покрытосеменных растений, защищающая развивающийся зародыш и часто принимающая участие в распространении семян путем привлечения животных, поедающих плоды. Внутри завязи расположен один или несколько **семязачатков**, которые содержат женские гаметы. Полностью сформированные семязачатки называют **семенами**. Семязачатки окружены одним или двумя слоями клеток, называемых **интегументами** (покровами). Интегументы покрывают **мегаспорангий**, который содержит клетки спорофита, претерпевающие мейоз для производства мегаспор (**рис. 6.30**). На поверхности интегументов есть небольшое отверстие, называемое **микропиле**, через которое пыльцевая трубка будет прорастать во время оплодотворения. Интегументы развиваются в **семенную кожуру**, которая защищает зародыш, создавая водонепроницаемый барьер. Таким образом, когда зрелый зародыш покидает родительское растение, он оказывается защищен двумя оболочками, образованными тканями диплоидного спорофита: семенной кожурой и плодом.

Внутри семязачатка в результате мейоза и неравномерного цитокенеза образуется четыре мегаспоры.

Наибольшая из них претерпевает три митотических деления и образует женский гаметофит — семиклеточный зародышевый мешок, содержащий восемь ядер (**рис. 6.30**). Одна из этих клеток — яйцеклетка, другая — центральная клетка. Две клетки синергиды окружают яйцеклетку, пыльцевая трубка при прорастании в зародышевый мешок проходит через одну из синергид. Пыльцевая трубка вносит два спермия. Один сливается с яйцеклеткой, а другой — с центральной клеткой, образуя полиплоидный эндосперм, который будет питать зародыш (и даже питать вас, если вы едите попкорн во время учебы). Как мы увидим в гл. 7, у покрытосеменных растений этот процесс называют двойным оплодотворением. Клетки антиподы в зародышевом мешке дегенерируют и, как принято считать, поддерживают эндосперм.

Механизмы определения пола управляют формированием репродуктивных органов и, следовательно, регулируют вид производимых гамет. Половые клетки растений могут быть покрыты защитными оболочками, в то время как гаметы животных, покидая гонады, оказываются почти на грани гибели. Однако если они встретятся, то может быть создан организм с продолжительностью жизни в десятилетия (и даже в столетия у определенных видов растений). Эта стадия — подготовительный этап к одному из величайших событий в жизненном цикле — оплодотворению.



С разрешения: Brian D. Peer

О фотографии в начале главы

Этот красный кардинал — гинандроморф, разделенный на мужскую (красные перья) и женскую (светло-коричневые перья) половины. Половина клеток несет кариотип ZW (самец) и половина — кариотип ZZ (самка; напомним, что для птиц характерно хромосомное определение пола ZW/ZZ), вероятно, это связано с тем, что во время мейоза полярному тельцу достается слишком много цитоплазмы. Позже происходит оплодотворение полярного тельца отдельным сперматозоидом и объединение с клетками, получившимися в результате оплодотворения яйцеклетки, с формированием мозаичного зародыша. У птиц каждая клетка принимает собственное решение при определении пола. У млекопитающих гормоны играют более существенную роль в формировании единого фенотипа и такие наполовину женские, наполовину мужские химеры не возникают (Zhao et al., 2010; Peer and Motz, 2014).

6

Коротко

Определение пола и гаметогенез

1. У млекопитающих гонадное определение пола (определение пола гонад) связано с функционированием половых хромосом. Люди с кариотипом XX, как правило, женского пола, а с кариотипом XY — мужского.
2. Y-хромосома млекопитающих играет ключевую роль в определении пола по мужскому типу. У эмбрионов как с кариотипом XX, так и с кариотипом XY гонада индифферентная (бипотенциальная). У эмбрионов с кариотипом XY происходит дифференцировка клеток Сертоли, которые поддерживают развитие половых клеток в канальцах семенника. Из интерстициальной мезенхимы дифференцируются другие клетки семенника, в частности, клетки Лейдига, вырабатывающие тестостерон.
3. У млекопитающих с кариотипом XX половые клетки окружены фолликулярными клетками в кортексе (наружной части) зачатка гонады. Эти эпителиальные клетки в составе фолликула становятся клетками гранулезы, а из мезенхимы дифференцируются клетки теки.
4. У людей ген *SRY*, расположенный на Y-хромосоме, кодирует фактор, направляющий дифференцировку гонады по мужскому типу, функционируя как транскрипционный фактор для активации эволюционно консервативного гена *SOX9*.
5. Продукт работы гена *SOX9* также может запускать дифференцировку семенника. В половом валике он работает как транскрипционный фактор, связываясь с геном, кодирующим антимюллеров гормон (АМГ), а также другими генами, необходимыми для развития семенника. Белки *Fgf9* и *Sox9* создают петлю положительной обратной связи, которая активирует развитие семенника и подавляет развитие яичника.
6. *Wnt4* и *Rspo1* участвуют в образовании яичников млекопитающих. Эти белки усиливают выработку β -катенина. Последний запускает развитие яичников, одновременно блокируя развитие семенников.
7. Вторичное определение пола у млекопитающих связано с работой факторов, синтезируемых развивающимися гонадами. У самцов мюллеров проток разрушается под действием АМГ, синтезируемого клетками Сертоли, а тестостерон, вырабатываемый клетками Лейдига, позволяет вольфовым каналам дифференцироваться в семявыносящий проток и семенные пузырьки. У самок вольфов канал дегенерирует из-за недостатка тестостерона, в то время как мюллеров проток сохраняется и дифференцируется под действием эстрогена в яйцеводы, матку, шейку матки и верхнюю часть влагалища. Люди с мутациями в генах, кодирующих эти гормоны или их рецепторы, могут иметь вторичные половые признаки, несоответствующие их гонадному полу.
8. У *Drosophila* пол определяет число X-хромосом в клетке, Y-хромосома не принимает участие в определении пола. В связи с отсутствием половых гормонов большинство клеток принимает независимое «решение» при определении пола.
9. Ген *Sex-lethal (Sxl)* у *Drosophila* активируется у самок, но у самцов белок *Sxl* не образуется из-за остановки трансляции. Белок *Sxl* работает как фактор сплайсинга РНК, отвечающий за удаление экзона со стоп-кодом из транскрипта *transformer (tra)*. В связи с этим у самок присутствует функциональный белок *Tra*, а у самцов нет.
10. Белок *Tra* является также фактором сплайсинга РНК, отвечающим за удаление экзона из транскрипта *doublesex (dsx)*. Транскрипция гена *dsx* идет как в клетках с кариотипом XX, так и в клетках

с кариотипом XY, но его пре-мРНК подвергается процессингу с образованием различных мРНК в зависимости от наличия или отсутствия белка Tga. Белки, синтезируемые с обоих вариантов мРНК, функциональны и активируют или ингибируют транскрипцию ряда генов, ответственных за формирование полового диморфизма у мух.

11. У многих беспозвоночных, рыб, черепах и аллигаторов пол часто обусловлен такими факторами окружающей среды, как температура.
12. У животных предшественниками гамет являются первичные половые клетки (ППК). У большинства видов ППК формируются экстрагонадно и мигрируют в гонады во время развития.
13. В цитоплазме ППК у многих видов животных содержатся ингибиторы транскрипции и трансляции, таким образом, ППК транскрипционно и трансляционно неактивны.
14. У большинства изученных животных соответствие типа половых клеток (сперматозоиды/яйцеклетки) полу животного (самец/самка) достигается благодаря сигналам, поступающим от гонад (семенника/яичника).
15. У людей и мышей половые клетки, заселяющие яичники, приступают к делениям мейоза во время эмбрионального развития; половые клетки, заселяющие семенник, не приступают к мейозу до наступления периода полового созревания.
16. Во время первого деления мейоза происходит разделение гомологических хромосом с образованием гаплоидных клеток. Во время второго деления мейоза идет разрушение кинетохора и разделение сестринских хроматид.
17. Для мейоза, протекающего во время сперматогенеза у млекопитающих, характерно образование

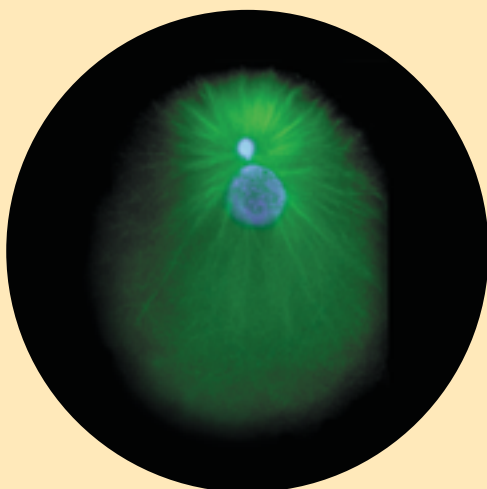
четырех гамет и отсутствие остановки деления. Мейоз, протекающий во время оогенеза, отличается образованием только одной зрелой половой клетки и длительной профазой первого деления, во время которой происходит рост яйцеклетки.

18. У самцов млекопитающих ППК формируют стволовые клетки, которые сохраняются на протяжении всей жизни организма. У самок млекопитающих ППК не становятся стволовыми клетками (хотя у животных из других групп ППК превращаются в стволовые клетки половой линии в яичниках).
19. У самок млекопитающих половые клетки вступают в мейоз и до овуляции останавливаются на профазе первого деления мейоза (на стадии диктиотены). Во время этой стадии происходит синтез мРНК и белков, которые будут использованы при узнавании гамет и на ранних этапах развития.
20. Определенные принципы органогенеза легко увидеть в развитии гонад: 1) продукты активации генов, которые активируют один путь дифференцировки, зачастую ингибируют другой возможный путь (например, Sox9 и β -катенин); 2) ген, активированный одним сигналом, может генерировать другие сигналы, которые будут поддерживать активацию гена, делая его независимым от исходного сигнала (например, Sox9); 3) активатор часто служит ингибитором ингибитора (например, веретено деления ооцитов при мейозе).
21. У покрытосеменных растений мужской и женский гаметофиты происходят из третьего и четвертого кругов заложения органов цветка соответственно. Их развитие обусловлено комплексом транскрипционных факторов, сформированным несколькими белками.
22. Пыльцевые зерна содержат два спермия, а семязачаток — одну женскую репродуктивную клетку.

Оплодотворение: начало нового организма



**Как ядра сперматозоида
и яйцеклетки находят друг друга**



С обложки журнала, посвященного J. Holy and G. Schatten. 1991. *Dev Biol* 147: 343–353

В ходе оплодотворения гаметы сперматозоид и яйцеклетка сливаются вместе для создания нового организма. Процесс имеет две основные цели — половую (комбинирование генетического материала двух родителей) и репродуктивную (формирование нового организма). Таким образом, первая функция оплодотворения заключается в передаче генов от родителей потомству, а вторая — в активации в цитоплазме яйца реакций, обеспечивающих дальнейшее развитие нового организма.

В настоящей главе термин «оплодотворение» будет объединять все процессы, происходящие после того, как гаметы покидают соответствующие гонады, и до момента слияния ядер сперматозоида и яйцеклетки и активации зиготы. В то время как непосредственное слияние сперматозоида и яйцеклетки называют амфимиксисом или сингамией (Kondrashov, 2018), термин «оплодотворение» подчеркивает, что у некоторых видов живых организмов, например у людей, ни сперматозоиды, ни яйцеклетки на момент выхода из гонады не вполне зрелые. Поэтому обсуждаемые в данной главе события, связанные с активацией и созреванием сперматозоидов и яйцеклеток, также крайне важны.

Мы обсудим только три вида оплодотворения: 1) наружное оплодотворение морских ежей — животных, у которых оплодотворение изучено лучше всего; 2) внутреннее оплодотворение млекопитающих; 3) двойное оплодотворение покрытосеменных растений. Эти модели фертилизации подсказывают, каким удивительным образом в ходе эволюции происходило объединение оплодотворения с возникновением генетического разнообразия. Детали оплодотворения различаются между видами, но обычно данный процесс состоит из четырех основных событий:

1. Контакт и взаимное узнавание сперматозоида и яйцеклетки. В большинстве случаев эти процес-

- сы гарантируют, что сперматозоид и яйцеклетка принадлежат животным одного и того же вида.
2. *Регуляция* процесса проникновения сперматозоида в яйцеклетку. Только одно ядро сперматозоида может в итоге объединиться с ядром яйцеклетки. Обычно это происходит благодаря тому, что только один сперматозоид может проникнуть внутрь яйцеклетки, после чего происходит активный запрет проникновения других сперматозоидов.
 3. *Слияние* генетического материала сперматозоида и яйцеклетки.
 4. *Активация* метаболизма яйцеклетки для дальнейшего развития.

Структура гамет

Прежде чем исследовать аспекты оплодотворения, необходимо рассмотреть строение сперматозоида и яйцеклетки — двух типов клеток, участвующих в оплодотворении. В некоторых отношениях они очень похожи, но при этом существенно различаются. Как было описано в гл. 6, оба типа принадлежат гаплоидным клеткам. У сперматозоида и яйцеклетки мембраны видоизменены таким образом, чтобы гаметы могли распознать и слиться друг с другом. Однако в то время как сперматозоид лишился большей части цитоплазмы, яйцеклетка сохранила ее и увеличилась в размере еще больше. Сперматозоид содержит гаплоидное ядро, жгутик (хвост), обеспечивающий активное движение, и мембрану с белками для распознавания яйцеклетки. Яйцеклетка тоже содержит гаплоидное ядро, но, в отличие от сперматозоида, у нее большой объем цитоплазмы с рибосомами, митохондриями и ферментами, необходимыми для дальнейшего развития.

Сперматозоид

Сперматозоиды были обнаружены в 1670-х гг., но их роль в оплодотворении была не ясна вплоть до середины 1800-х гг. Только в 1840 г., после того как Альберт фон Келликер описал формирование сперматозоидов из клеток семенника взрослой особи, могло начаться полноценное исследование процесса оплодотворения. И все же Келликер отрицал физическое взаимодействие сперматозоида с яйцеклеткой (Farley, 1982; Pinto-Correia, 1997). Он полагал, что сперматозоид активирует яйцеклетку точно так же, как магнит сообщает о своем присутствии железу. Первое описание процесса оплодотворения было опубликовано Карлом Эрнстом фон Бэром в 1847 г. Он показал, что у морских ежей и оболочников происходит слияние сперматозоидов и яйцеклеток (Raineri и Tammiksaar, 2013). Он описал появление оболочки оплодотворения, миграцию ядра сперматозоида в центр яйцеклетки и последующие ранние этапы деления развивающейся клетки.

АНАТОМИЯ СПЕРМАТОЗОИДА

Каждый сперматозоид содержит гаплоидное ядро, приспособления для активного передвижения и мешочек с ферментами, необходимыми для проникновения через оболочку яйцеклетки. У большинства видов живых организмов почти вся цитоплазма удаляется во время созревания сперматозоида, остаются только определенные органеллы, приспособленные для обеспечения функциональной активности сперматозоидов (рис. 7.1А, Б). Во время созревания ядро сперматозоида приобретает обтекаемую форму, а ДНК подвергается очень плотной упаковке. Спереди и по бокам от этого сжатого гаплоидного ядра располагается **акросома** или **акросомная везикула** (рис. 7.1В). Акросома (производное аппарата Гольджи) содержит ферменты, расщепляющие белки и сложные сахара. Ферменты, содержащиеся в акросоме, необходимы для создания отверстия в оболочке яйцеклетки, через которое сперматозоид сможет проникнуть внутрь. У многих видов живых организмов между акросомой и ядром сперматозоида расположена область с мономерами актина. Полимеризация актина способствует образованию пальцеобразного **акросомного выроста** на ранних этапах оплодотворения. У морских ежей и многих других видов животных в процесс узнавания сперматозоидом яйцеклеткой вовлечены молекулы, расположенные на мембране акросомного выроста. Акросома и ядро вместе составляют **головку сперматозоида**.

Способы передвижения сперматозоидов варьируют, в зависимости от того как каждый конкретный вид адаптировался к условиям окружающей среды. У большинства видов живых организмов сперматозоиды движутся благодаря биению жгутика. Основная моторная часть жгутика **аксонема** образована микротрубочками, расходящимися от одной из двух центриолей, расположенных около ядра сперматозоида (Avidor-Reiss и Fishman, 2019). В центре аксонемы находится пара центральных микротрубочек, окруженных девятью дуплетами микротрубочек. Микротрубочки состоят исключительно из димерного белка тубулина. Однако вторая центриоль тоже важна, так как она будет входить в яйцеклетку вместе с ядром сперматозоида и принимать участие в формировании веретена первого деления дробления (Fishman et al., 2018).

Хотя тубулин является основным белком, другие белки также важны для нормального функционирования жгутика. Биение жгутика, необходимое для перемещения сперматозоида, обеспечивает **динеин** — белок, прикрепленный к микротрубочкам. Динеин представляет собой АТФазу — фермент, который гидролизует АТФ, превращая выделенную химическую энергию в механическую¹. Выделившаяся энер-

¹ Яйцеклетка проще, чем кажется. Терминология, используемая при описании женских гамет, может сбивать с толку. В общем случае яйцеклетка — гамета, способная связывать-

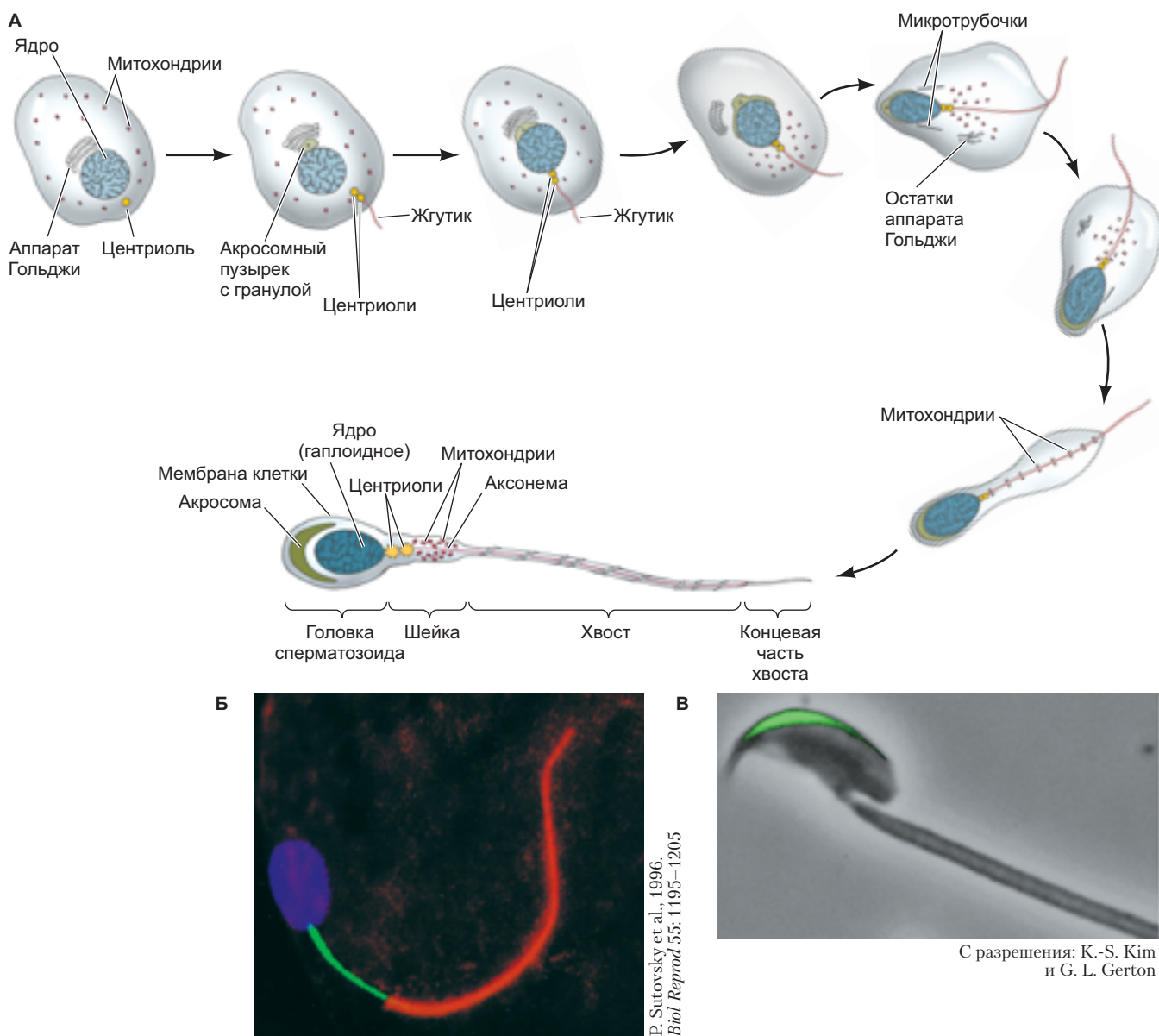


Рис. 7.1. Изменения, которые претерпевает половая клетка при образовании сперматозоида млекопитающих. **А.** Центриоль удваивается, одна из центриолей участвует в образовании жгутика на заднем (постериорном) конце сперматозоида; другая центриоль при оплодотворении попадет внутрь яйцеклетки. Из аппарата Гольджи образуется акросомный пузырек на будущем переднем (антериорном) конце сперматозоида. Митохондрии собираются вокруг основания жгутика около ядра в шейке сперматозоида. Оставшаяся цитоплазма сбрасывается, а ядро конденсируется. Размер зрелого сперматозоида увеличивается по сравнению с предыдущими стадиями. **Б.** Зрелый сперматозоид быка. ДНК окрашена в голубой цвет, митохондрии — в зеленый цвет, тубулин в составе жгутика — в красный цвет. **В.** Акросомный пузырек сперматозоида мыши окрашен в зеленый цвет благодаря слиянию проакрозина с зеленым флуоресцентным белком (GFP). (Рис. А по данным: Y. Clermont and C. P. Leblond. 1955. *Am J Anat* 96: 229–253.)

ся со сперматозоидом, иначе говоря, способная к оплодотворению. Ооцит — развивающаяся яйцеклетка, которая еще не способна связываться со сперматозоидом, или быть оплодотворенной (Wessel, 2009). Трудности терминологии вызваны тем, что яйцеклетки у разных видов животных находятся на разных стадиях мейоза (см. рис. 7.3). Например, яйцеклетка человека во время оплодотворения находится

на стадии метафазы второго деления мейоза, а у морского ежа она к этому моменту уже завершила все деления созревания. Содержимое яйцеклетки тоже различается между видами. Наибольшее количество цитоплазмы характерно для *Aepyornis*, вымершей гигантской птицы, обитавшей на Мадагаскаре. Яйца этих птиц достигали 1 м в окружности, объем одного яйца составлял около 7,5 л.

гия позволяет микротрубочкам скользить друг относительно друга, вызывая изгибание жгутика (Ogawa et al., 1977; Shinyoji et al., 1998). АТФ, необходимый для движения жгутика и перемещения сперматозоида, синтезируется в митохондриях, расположенных в **шейке сперматозоида** (рис. 7.1А). У многих видов животных (особенно это характерно для млекопитающих) между митохондриями и мембраной клетки расположен слой плотных фибрилл. Этот волокнистый слой укрепляет хвост сперматозоида. Поскольку толщина слоя уменьшается по направлению к кончику хвоста, волокна, вероятно, повышают эффективность продвижения вперед, предохраняя головку сперматозоида от слишком резкого вращения. Таким образом, сперматозоид подвергается существенной модификации для выполнения функции передачи своего ядра яйцеклетке.

Яйцеклетка

ЦИТОПЛАЗМА И ЯДРО

Весь материал, необходимый для начальных этапов роста и развития организма, должен быть запасен в яйцеклетке. В то время как сперматозоид при созревании утрачивает большую часть цитоплазмы, развивающаяся яйцеклетка (называемая ооцитом до достижения стадии мейоза, на которой наступает оплодотворение) не только сохраняет, но и активно накапливает материал, необходимый для дальнейшей жизни. Во время мейотического деления, когда формируется ооцит, происходит сохранение объема цитоплазмы в одной клетке, а не распределение ее поровну между двумя сестринскими клетками. В то же время ооцит дополнительно синтезирует и поглощает извне белки, которые представляют

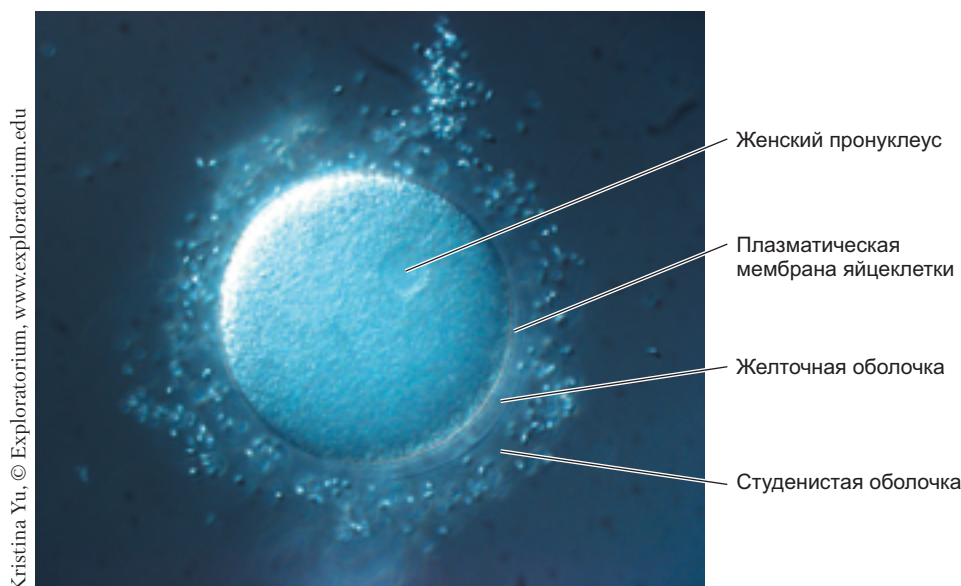
собой запас питательных веществ для развивающегося эмбриона. Яйца птиц — огромные отдельные клетки, увеличенные из-за накопленного желтка (см. рис. 12.2). Даже яйцеклетки с относительно небольшим содержанием желтка по размеру существенно больше сперматозоидов. Объем яйцеклетки морского ежа составляет около 200 пиколитров (2×10^{-4} мм³), что более чем в 10 000 раз превышает объем сперматозоида морского ежа (рис. 7.2). Таким образом, несмотря на то что сперматозоиды и яйцеклетки имеют одинаковые гаплоидные ядра, яйцеклетка накапливает большой объем цитоплазмы во время созревания. В этой запасенной цитоплазме содержатся:

- **Питательные вещества.** Клеткам эмбрионов на ранних стадиях необходим запас энергии и аминокислот. У многих видов живых организмов он достигается благодаря накоплению желтка в яйцеклетке. Белки, формирующие гранулы желтка, синтезируются в таких органах, как печень, жировое тело, и с током крови поступают в яичник и захватываются ооцитом.

- **Рибосомы и тРНК.** Ранний эмбрион должен синтезировать собственные структурные белки и ферменты. У некоторых видов живых организмов вскоре после оплодотворения начинается быстрый синтез белков. Он достигается благодаря рибосомам и тРНК, запасенным в цитоплазме яйцеклетки еще до оплодотворения. У развивающихся яйцеклеток есть специальный механизм синтеза рибосом. Ооциты некоторых амфибий во время профазы мейоза производят до 10^{12} рибосом.

- **Информационные (матричные) РНК (мРНК).** Ооцит накапливает не только белки, но и мРНК, которые кодируют белки, необходимые для прохождения ранних стадий развития. Показано, что в яйцеклетках морских ежей содержатся тысячи раз-

Рис. 7.2. Строение яйцеклетки морского ежа при оплодотворении. Сперматозоиды заметны в студенистой оболочке яйцеклетки, а также они прикреплены к желточной оболочке. Женский пронуклеус четко виден в цитоплазме яйцеклетки



Kristina Yu. © Exploratorium, www.exploratorium.edu

личных мРНК, остающихся неактивными до момента оплодотворения.

- **Морфогенетические факторы.** Молекулы, направляющие дифференцировку клеток в определенный тип, тоже присутствуют в яйцеклетке. К ним относят факторы транскрипции и паракринные факторы. У многих видов живых организмов эти факторы локализованы в различных областях яйцеклетки и при дроблении распределяются между отдельными клетками.

- **Защитные химические вещества.** Поскольку эмбрион не может убежать от хищника или переместиться в более безопасную среду, он должен иметь средства защиты. Большинство яйцеклеток содержат ферменты, осуществляющие репарацию ДНК и защиту от повреждения ультрафиолетовым светом, кроме того, часть яйцеклеток содержат молекулы, которые для многих потенциальных хищников неприятны на вкус. В желтке яиц птиц содержатся антитела, защищающие эмбрион от патогенных микроорганизмов.

В огромном объеме цитоплазмы яйцеклетки расположено крупное ядро (рис. 7.2). У одних видов живых организмов (например, морских ежей) женский пронуклеус является гаплоидным уже во время оплодотворения. У других видов (включая многих червей и насекомых) ядро яйцеклетки диплоидно — сперматозоид проникает внутрь до завершения делений созревания (делений мейоза) яйцеклетки (рис. 7.3). У этих животных мейотические деления яйцеклетки

завершаются после того, как ядро сперматозоида — мужской пронуклеус — входит в цитоплазму яйцеклетки.

ПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА И ОБОЛОЧКА ЯЙЦЕКЛЕТКИ

Плазматическая мембрана, окружающая цитоплазму яйцеклетки, регулирует транспорт ионов во время оплодотворения, а также обладает способностью сливаться с мембраной сперматозоида. Снаружи от нее расположен внеклеточный матрикс, который образует волокнистый слой, принимающий участие в процессе взаимного узнавания сперматозоида и яйцеклетки (Wassarman and Litscher, 2016). У беспозвоночных эту структуру обычно называют **желточной оболочкой** (рис. 7.4А), и она состоит из нескольких различных гликопротеинов. В желточную оболочку проникают гликопротеиновые выросты плазматической мембраны и белковые комплексы, так называемые столбы, которые обеспечивают ее прикрепление к плазматической мембране (Mozingo and Chandler, 1991). Желточная оболочка необходима для видоспецифичного связывания сперматозоидов. У многих типов яйцеклеток есть дополнительный студенистый слой, расположенный снаружи от желточной оболочки. Эта гликопротеиновая сеть может выполнять множество функций, но наиболее распространенной

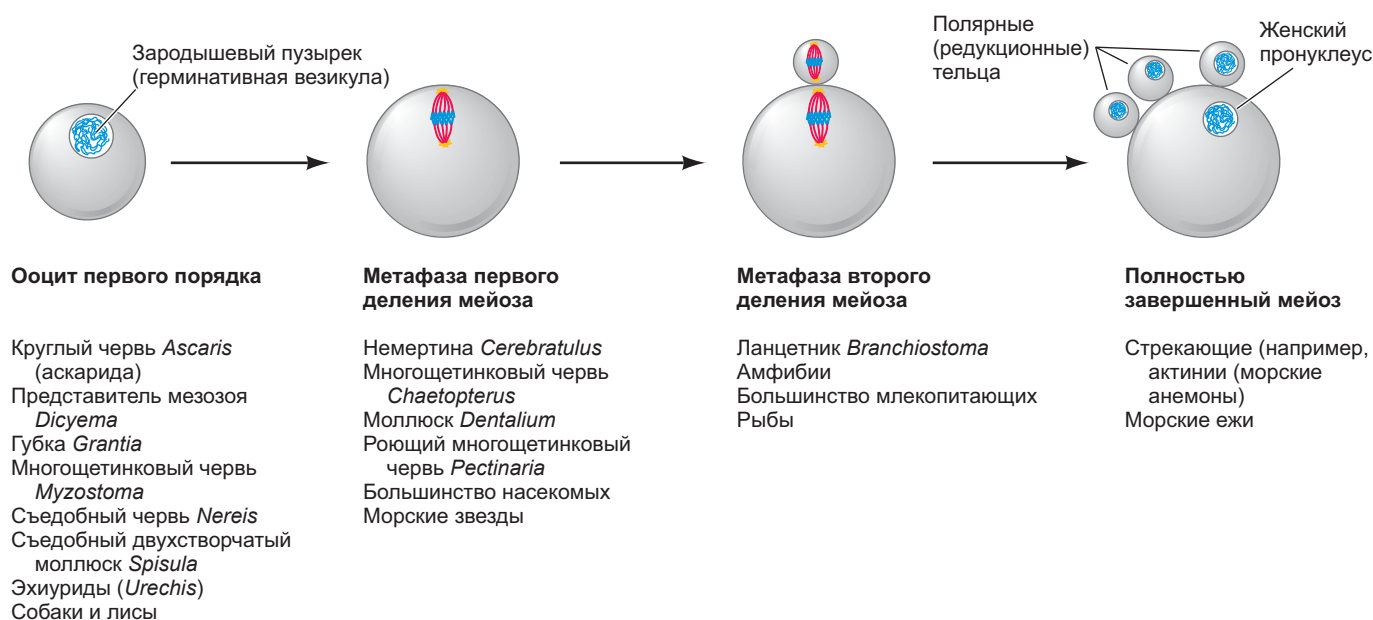


Рис. 7.3. Стадии созревания ооцитов разных видов животных в момент проникновения сперматозоида. Обратите внимание, что у большинства видов сперматозоид проникает в яйцеклетку еще до того, как ядро яйцеклетки завершит стадии деления созревания (стадии мейоза). Зародышевый пузырек (герминативная везикула) — крупное диплоидное ядро ооцита первого порядка. Полярные (редукционные) тельца — нефункциональные клетки, образовавшиеся в результате мейотических делений (см. гл. 6). (По данным: C. R. Austin, 1965. *Fertilization*. Prentice-Hall: Englewood Cliffs, NJ.)

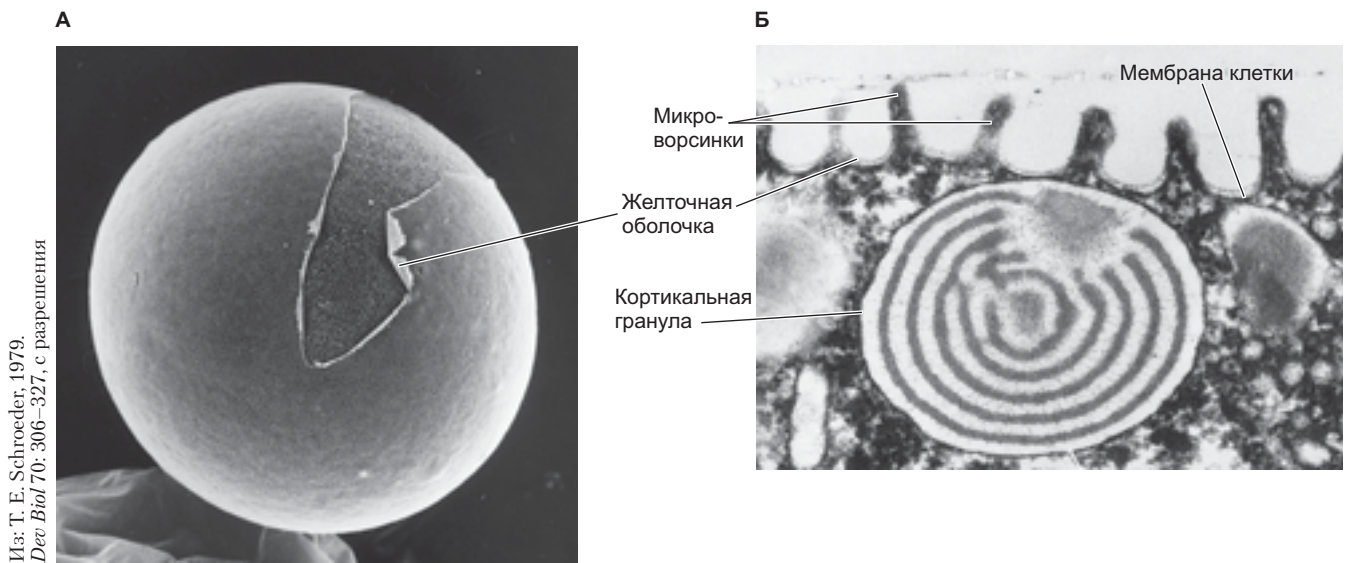


Рис. 7.4. Поверхность яйцеклетки морского ежа. **А.** Микрофотография яйцеклетки перед оплодотворением, полученная на сканирующем электронном микроскопе. Плазматическая мембрана клетки видна там, где была разорвана желточная оболочка. **Б.** Микрофотография неоплодотворенной яйцеклетки морского ежа, полученная при помощи просвечивающего электронного микроскопа, демонстрирующая микроворсинки и плазматическую мембрану, к которой плотно примыкает желточная оболочка. Кортикальная гранула располагается непосредственно под мембраной яйцеклетки

является привлечение и/или активация сперматозоидов.

Непосредственно под плазматической мембраной у большинства яйцеклеток расположен тонкий слой (около 5 мкм) гелеобразной цитоплазмы, называемый **кортексом** или кортикальным слоем. Он более жесткий, чем внутренние слои цитоплазмы, и содержит большое количество молекул глобулярного актина. Во время оплодотворения молекулы актина полимеризуются и образуют длинные нити актиновых **микрофиламентов**, необходимые для последующего деления клетки. Кроме того, они увеличивают поверхность яйцеклетки, создавая выросты, называемые **микроворсинками**, которые способствуют проникновению сперматозоида внутрь яйцеклетки (рис. 7.4Б). В кортикальном слое расположены также **кортикальные гранулы**. Эти мембранные образования — производные аппарата Гольджи. Они содержат протеолитические ферменты и являются гомологом акросомы сперматозоида. В то время как у сперматозоида морского ежа есть только один акросомный пузырек, в каждой яйцеклетке морского ежа содержится приблизительно 15 000 кортикальных гранул. В дополнение к ферментам в кортикальные гранулы включены гликозаминогликаны, гликопротеины адгезии и гиалин. Как будет описано ниже, ферменты и гликозаминогликаны помогают предотвратить полиспермию, т. е. проникновение дополнительных сперматозоидов в яйцеклетку после того, как один из них уже проник внутрь, а гиалин и другие гликопротеины адгезии, окружающие ранний эмбрион,

обеспечивают физическую поддержку бластомеров при дроблении.

У яйцеклеток млекопитающих оболочка представлена отдельным толстым матриксом, который носит название ***zona pellucida*** (блестящая оболочка). Кроме того яйцеклетка млекопитающих окружена слоем фолликулярных клеток — **кумулясом**, обеспечивающим питание ооцита во время овуляции (рис. 7.5). Сперматозоиды млекопитающих должны пройти сквозь него, чтобы оплодотворить яйцеклетку. Самый глубокий слой клеток кумулюса, непосредственно примыкающий к ***zona pellucida***, называют ***corona radiata*** (лучистый венец).

Узнавание сперматозоида яйцеклеткой

Взаимодействие сперматозоида и яйцеклетки происходит в пять этапов (Vasquier, 1998):

1. **Хемотаксис** — привлечение сперматозоида к яйцеклетке выделяемыми ею растворимыми молекулами.
2. **Связывание сперматозоида** с внеклеточным матриксом яйцеклетки (студенистой оболочкой или ***zona pellucida***).
3. **Экзоцитоз** акросомного пузырька и выброс литических ферментов, содержащихся внутри него.
4. **Проникновение сперматозоида** через внеклеточный матрикс к плазматической мембране яйцеклетки.
5. **Слияние** мембран сперматозоида и яйцеклетки.

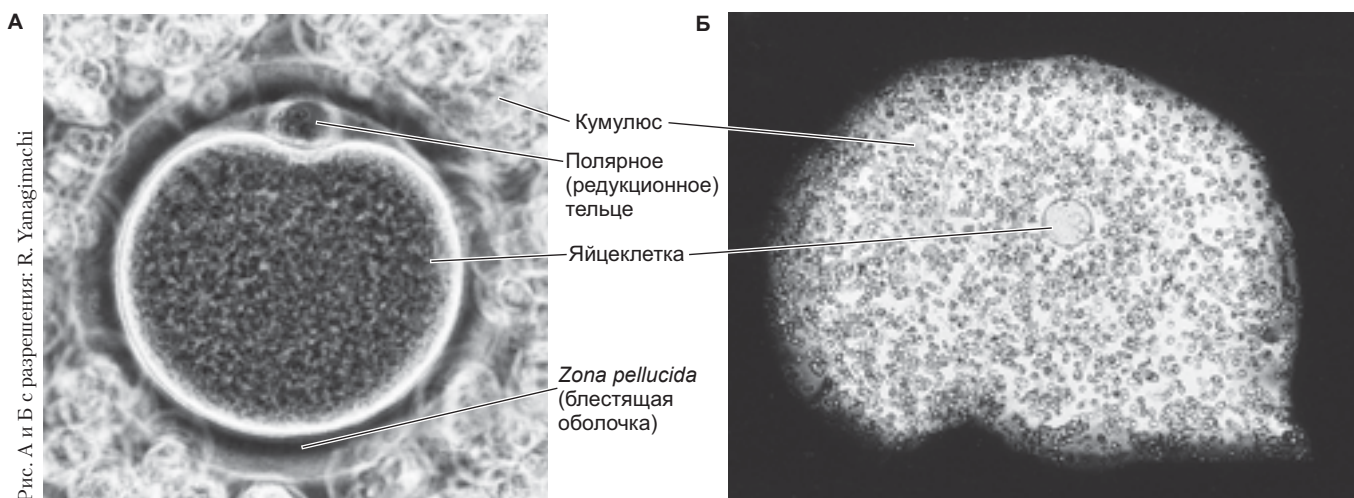


Рис. 7.5. Яйцеклетки млекопитающих непосредственно перед оплодотворением. **А.** Яйцеклетка хомяка покрыта *zona pellucida*, которая в свою очередь окружена клетками кумулюса. Образовавшееся в результате мейоза полярное тельце хорошо заметно под блестящей оболочкой. **Б.** При меньшем увеличении показан ооцит мыши, окруженный клетками кумулюса. Частицы коллоидного углерода (частицы туши, видимые как черный фон) не проходят внутрь благодаря матриксу на основе гиалуроновой кислоты

После того как все этапы пройдены, может произойти встреча гаплоидных ядер сперматозоида и яйцеклетки, а также активация реакций, запускающих дальнейшие этапы развития организма. В данной главе мы сосредоточимся на описании этих событий у трех наиболее хорошо изученных организмов:

морских ежей, для которых характерно наружное оплодотворение, мышей, для которых характерно внутреннее оплодотворение, а также *Arabidopsis thaliana* — покрытосеменного растения, хорошо известного исследователям, для которого характерно двойное оплодотворение.

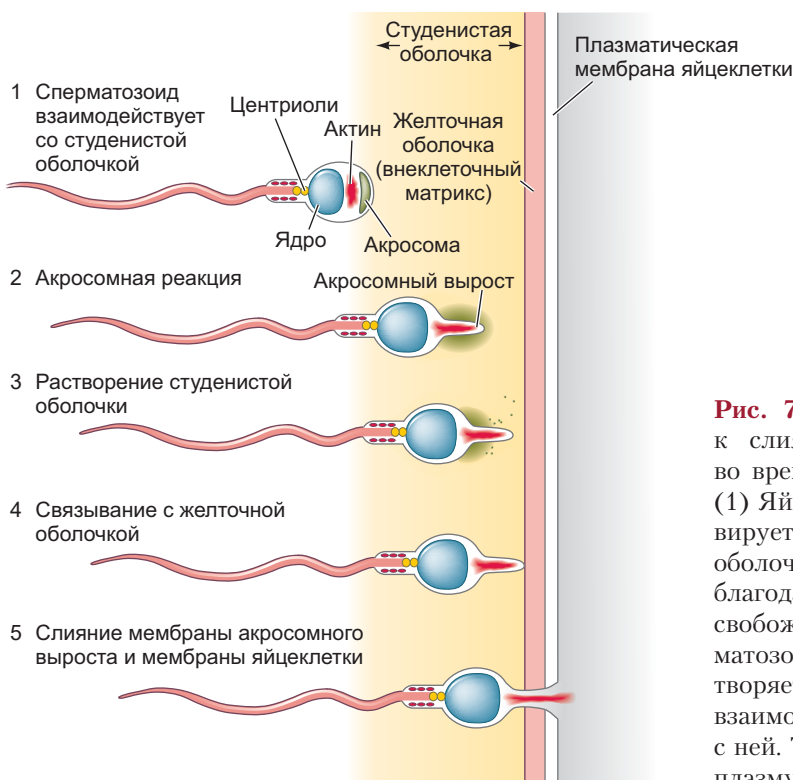


Рис. 7.6. Краткое изложение событий, приводящих к слиянию мембран сперматозоида и яйцеклетки во время наружного оплодотворения у морского ежа. (1) Яйцеклетка путем хемотаксиса привлекает и активирует сперматозоиды. (2, 3) Контакт со студенистой оболочкой яйцеклетки запускает акросомную реакцию, благодаря чему формируется акросомный вырост и высвобождаются протеолитические ферменты. (4) Сперматозоид взаимодействует с желточной оболочкой, растворяет ее, и образуется отверстие. (5) Сперматозоид взаимодействует с мембраной яйцеклетки и сливается с ней. Теперь ядро сперматозоида может войти в цитоплазму яйцеклетки

Наружное оплодотворение у морского ежа

Привлечение сперматозоидов: действие на расстоянии

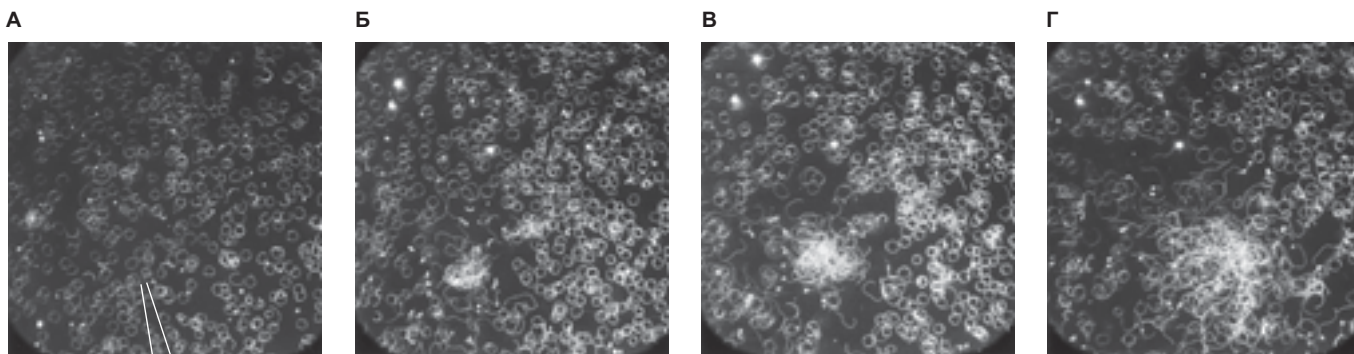
События, имеющие место при встрече и слиянии сперматозоида с яйцеклеткой, представлены на **рис. 7.6**. Как и многие морские организмы, морские ежи выметывают половые продукты в окружающую среду. В качестве нее может выступить как маленький водоем — литоральная лужа, так и Мировой океан, в котором живут другие организмы, размножающиеся в то же время. У этих организмов возникает две проблемы: как сперматозоиды и яйцеклетки могут встретиться в условиях такого большого объема и как можно предотвратить оплодотворение сперматозоидом одного вида яйцеклетки другого вида? Помимо производства большого количества гамет для решения этих проблем было выработано два основных механизма: видоспецифичное привлечение сперматозоидов и видоспецифичная активация сперматозоидов.

Видоспецифичное привлечение сперматозоидов было описано для многих видов живых организмов, включая стрекающих, моллюсков, иглокожих, амфибий и оболочников (Miller, 1985; Yoshida et al., 1993; Burnett et al., 2008). У многих животных сперматозоиды привлекаются к яйцеклеткам своего вида благодаря хемотаксису, т. е. движению, направленному по градиенту концентрации химического вещества, выделяемого яйцеклеткой. Таким образом, ооциты контролируют не только тип привлекаемых сперматозоидов, но и время, в которое сперматозоиды могут их достичь, секретируя хемоаттрактант только после того, как яйцеклетка достигнет зрелости (Miller, 1978).

У морских ежей хемоаттрактанты — это небольшие белковые молекулы, называемые пептидами, активирующими сперматозоиды (SAP). Путем диффузии они поступают в морскую воду из студенистой оболочки яйцеклетки. Одним из таких белков является резакт. Он состоит из 14 аминокислот, выделен из оболочки морского ежа *Arbacia punctulata* (Ward et al., 1985) и оказывает воздействие даже в очень низких концентрациях (**рис. 7.7**): связывания даже одной действующей молекулы может быть достаточно, чтобы обеспечить направление сперматозоидов по градиенту концентрации этого вещества, пока они не достигнут яйцеклетки (Каурр et al., 2003; Kirkman-Brown et al., 2003).

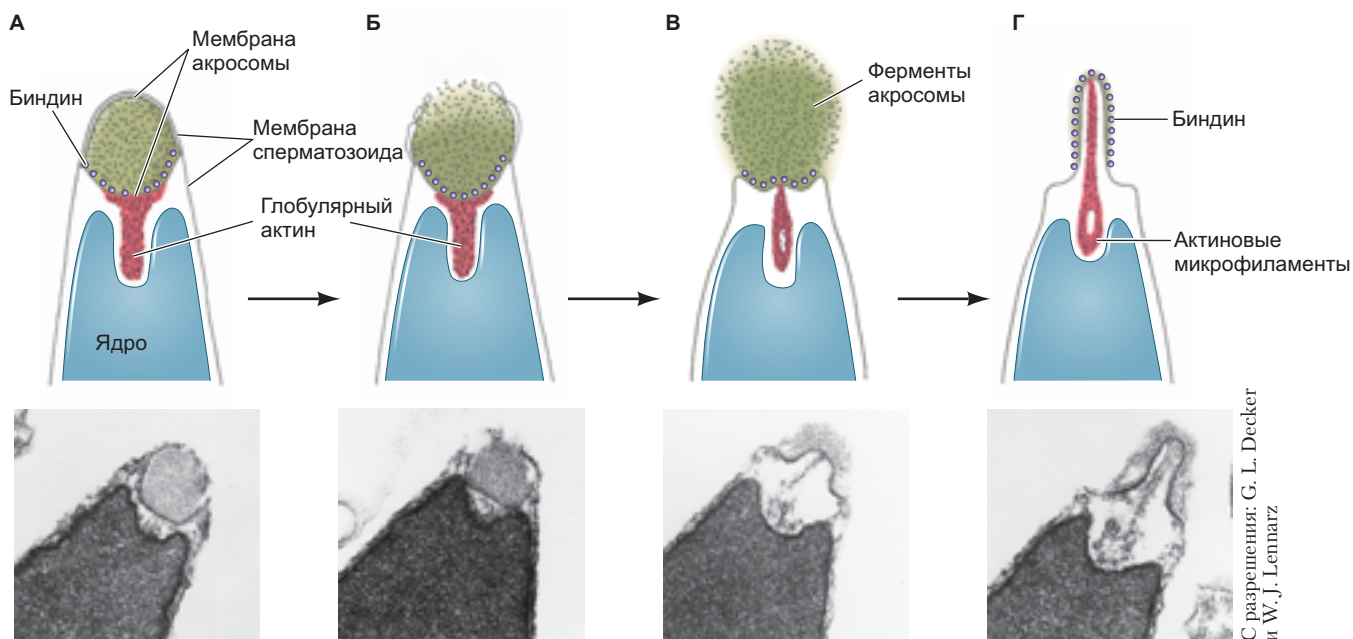
Акрсомная реакция

На втором этапе взаимодействия сперматозоида со студенистой оболочкой яйцеклетки приводит к развитию **акросомной реакции**. У большинства морских беспозвоночных этот процесс идет в две стадии: слияние акросомы с мембраной сперматозоида (происходит экзоцитоз содержимого акросомы) и образование выпячивания, которое носит название «акросомный вырост» (Dan, 1952; Colwin and Colwin, 1963). Акросомную реакцию у морских ежей запускает контакт сперматозоида со студенистой оболочкой яйцеклетки (**рис. 7.8**). Ферменты акросомы, расщепляющие белки, позволяют сделать отверстие в оболочке яйцеклетки. Как только сперматозоид достигает поверхности яйцеклетки, акросомный вырост взаимодействует с желточной оболочкой и сперматозоид связывается с яйцеклеткой. Вероятно, акросомный вырост покрыт крупными комплексами протеолитических белков, содержащимися в акросоме, что позволяет растворить желточную оболочку в месте взаимодействия и продвинуться в сторону мембраны яйцеклетки (Yokota and Sawada, 2007).



G. E. Ward et al., 1985. *J Cell Biol* 101: 2324–2329, с разрешения V. D. Vacquier

Рис. 7.7. Хемотаксис у сперматозоидов морского ежа *Arbacia punctulata*. В каплю суспензии сперматозоидов объемом 20 мкл добавили 1 нл 10-наномолярного (10 нМ) раствора резакта. **А.** На фотографии показаны сперматозоиды, которые двигались по круговым траекториям до добавления резакта, время экспозиции — 1 с. Место внесения пипетки с раствором обозначено белыми линиями. **Б–Г.** Показана миграция сперматозоидов по повышению градиента концентрации через 20, 40 и 90 с после добавления резакта, время экспозиции — 1 с



С разрешения: G. L. Decker
и W. J. Lennarz

Рис. 7.8. Акросомная реакция сперматозоида морского ежа. А–В. Часть мембраны акросомы, располагающаяся непосредственно под мембраной сперматозоида, сливается с ней, и происходит высвобождение содержимого акросомы. Г. Молекулы актина собираются в микрофиламенты, обеспечивая удлинение акросомного выроста. Фотографии акросомной реакции представлены под схемой. (По данным: R. G. Summers and B. L. Hylander, 1974. *Cell Tissue Res* 150: 343–368.)

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ АКРОСОМНОЙ РЕАКЦИИ У МОРСКОГО ЕЖА

У морских ежей акросомную реакцию запускают сульфатсодержащие полисахариды студенистой оболочки, которые связываются со специфичными рецепторами, расположенными на мембране сперматозоида над акросомой. Эти полисахариды видоспецифичны, и факторы, содержащиеся в студенистой оболочке ежей одного вида, не способны запустить акросомную реакцию у сперматозоидов другого вида, даже близкого (рис. 7.9; Hirohashi and Vacquier, 2002; Hirohashi et al., 2002; Vilela-Silva et al. 2008). Таким образом, специфичная активация акросомной реакции выполняет функцию предотвращения межвидового (и, следовательно, нежизнеспособного) оплодотворения. Это важно в том случае, когда множество видов животных обитает в одном месте и сроки их размножения пересекаются.

Распознавание оболочки яйцеклетки

Взаимодействие сперматозоида морского ежа со студенистой оболочкой яйцеклетки обеспечивает развитие начальных этапов видоспецифичного распознавания гамет (например, привлечения сперматозоидов, активации и акросомной реакции). Другим крити-

чески важным событием видоспецифичного распознавания, которое должно произойти, является прохождение сперматозоида через студенистую оболочку и контакт акросомного выроста с поверхностью яйцеклетки (рис. 7.10А). Нерастворимый белок с молекулярной массой 30 500 Да, располагающийся на внутренней мембране акросомы и опосредующий такое узнавание у морских ежей, называют **биндином**. В 1977 г. этот белок выделила из акросомы сперматозоида морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* группа исследователей во главе с Vacquier, и было обнаружено, что биндин способен связываться с яйцеклетками того же вида, лишенными студенистой оболочки (рис. 7.10Б). Кроме того, биндин сперматозоидов, как и полисахариды студенистой оболочки, обычно видоспецифичен: выделенный из акросомы сперматозоидов *S. purpuratus*, он связывается с яйцеклетками своего вида, но не связывается с яйцеклетками *S. franciscanus* (рис. 7.10В; Glabe and Vacquier, 1977; Glabe and Lennarz, 1979); аминокислотные последовательности молекул биндина тоже видоспецифичны (Kamei and Glabe, 2003).

Слияние мембран сперматозоида и яйцеклетки

Как только сперматозоид проник через оболочки яйцеклетки и прошла акросомная реакция, может начаться процесс слияния мембран сперматозоида

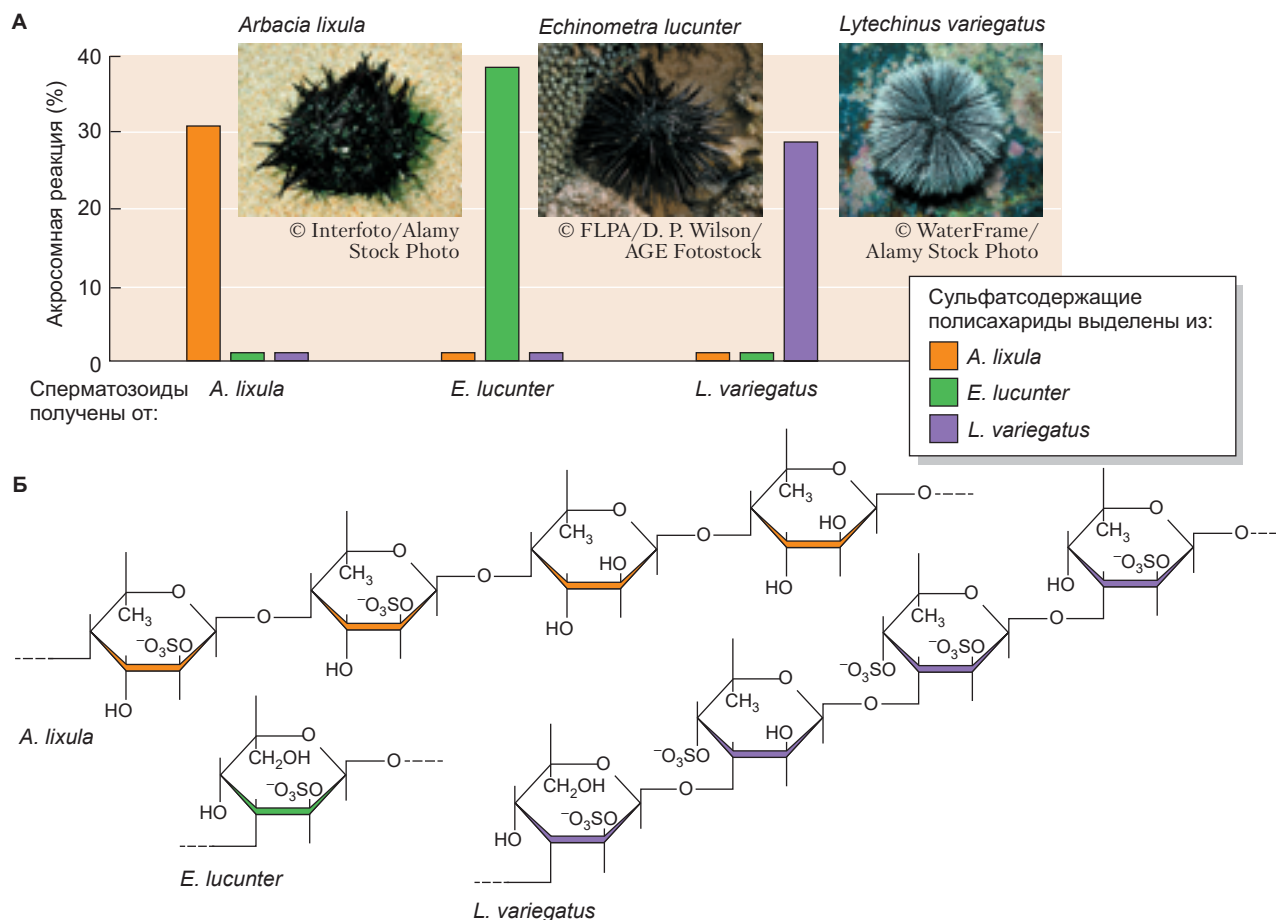


Рис. 7.9. Видоспецифичная активация акросомной реакции сульфатсодержащими полисахаридами, характерными для студенистой оболочки трех видов морских ежей, обитающих на литорали вокруг Рио-де-Жанейро. **А.** Сравнение способности каждого полисахарида вызывать акросомную реакцию у сперматозоидов разных видов. **Б.** Особенности химической структуры полисахаридов, вызывающих развитие акросомной реакции, демонстрирующие видоспецифичные различия. (По данным: A. P. Alves et al., 1997. *J Biol Chem* 272: 6965–6971.)

и яйцеклетки (рис. 7.11). Взаимодействие сперматозоида с яйцеклеткой вызывает полимеризацию актина в яйцеклетке, что приводит к формированию воспринимającego бугорка (бугорка оплодотворения) (Summers et al., 1975). Это служит подтверждением гомологичности мужских и женских гамет, так как акросомный вырост сперматозоида тоже формируется благодаря полимеризации актина. Актин, содержащийся в гаметах, способствует расширению цитоплазматического мостика между сперматозоидом и яйцеклеткой, по которому перемещаются ядро, центриоль и даже хвост сперматозоида внутрь яйцеклетки.

Слияние — активный процесс, происходящий при посредничестве специфичных «фузогенных» белков. У морских ежей биндин выполняет и вторую функцию — функцию «фузогенного» белка. В дополнение к узнаванию яйцеклетки биндин содержит рядом с N-концом длинную последовательность, состоящую из гидрофобных аминокислот, которая способна вызывать слияние фосфолипидных везикул в условиях *in vitro* (Ulrich et al., 1999; Gage et al., 2004). В зрелой

неоплодотворенной яйцеклетке поддерживается такая концентрация ионов, в которой биндин способен вызывать слияние мембраны сперматозоида и яйцеклетки.

Предотвращение полиспермии: одна яйцеклетка, один сперматозоид

Как только один сперматозоид проникает внутрь яйцеклетки, свойства ее мембраны обеспечивать слияние с мембраной сперматозоида, необходимое для попадания сперматозоида внутрь, начинают представлять опасность для будущего организма. Обычно при **моноспермии** только один сперматозоид проникает в яйцеклетку и гаплоидное ядро сперматозоида соединяется с гаплоидным ядром яйцеклетки с образованием диплоидного ядра зиготы (оплодотворенной яйцеклетки). Таким образом происходит восстановление числа хромосом, характерное для данного вида. Во время дробления центриоль, предоставленная сперматозоидом, делится, образуя

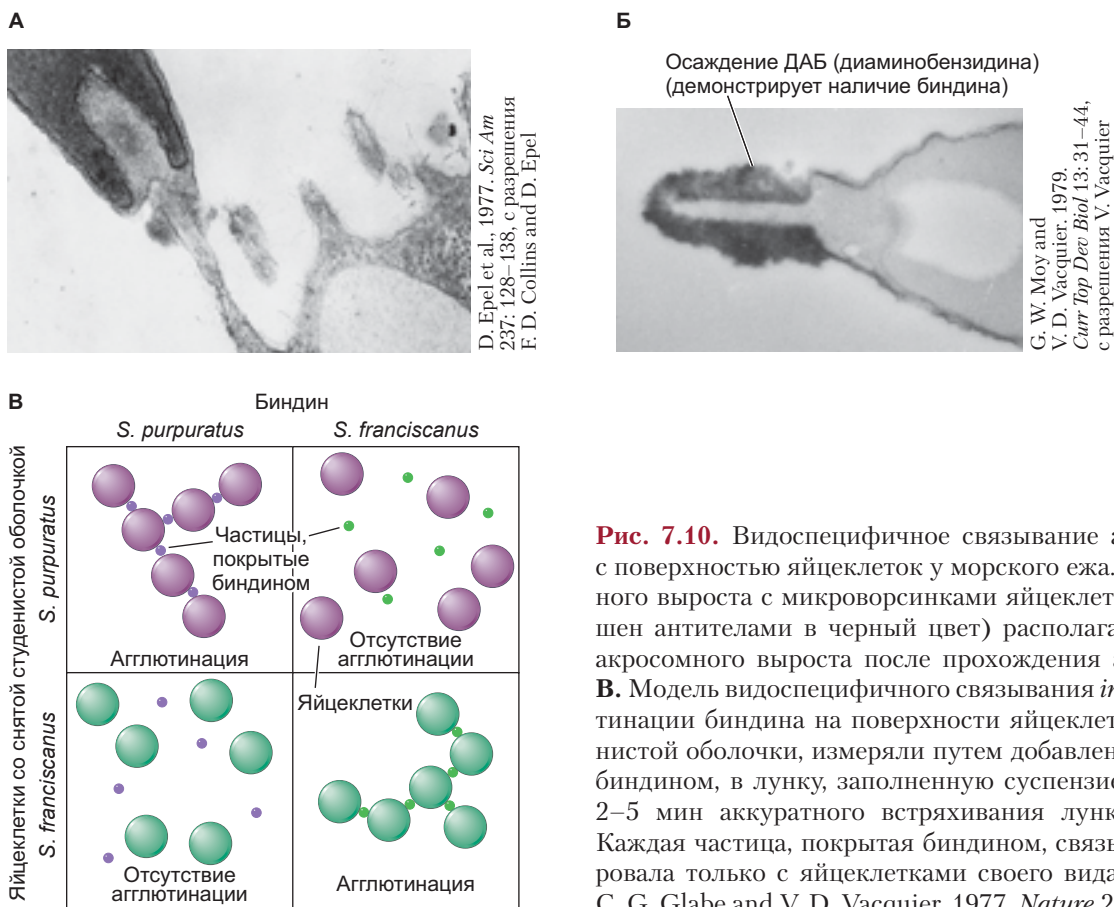


Рис. 7.10. Видоспецифичное связывание акросомного выроста с поверхностью яйцеклеток у морского ежа. **А.** Контакт акросомного выроста с микроворсинками яйцеклетки. **Б.** Биндин (окрашен антителами в черный цвет) располагается на поверхности акросомного выроста после прохождения акросомной реакции. **В.** Модель видоспецифичного связывания *in vitro*. Уровень агглютинации биндина на поверхности яйцеклеток, лишенных студенистой оболочки, измеряли путем добавления частиц, покрытых биндином, в лунку, заполненную суспензией яйцеклеток. Через 2–5 мин аккуратного встряхивания лунки фотографировали. Каждая частица, покрытая биндином, связывалась и агглютинировала только с яйцеклетками своего вида (Рис. В по данным: C. G. Glabe and V. D. Vacquier, 1977. *Nature* 267: 836–838.)

два полюса веретена деления, в то время как центриоль яйцеклетки деградирует.

У большинства животных любой сперматозоид, проникший в яйцеклетку, предоставляет гаплоидное ядро и центриоль. Одновременное проникновение нескольких сперматозоидов — **полиспермия** — в основном приводит к катастрофическим последствиям. У морских ежей оплодотворение двумя сперматозои-

дами приводит к возникновению триплоидного ядра, в котором каждая хромосома представлена в тройном количестве, а не в двойном. Хуже того, центриоль каждого сперматозоида удваивается, поэтому вместо биполярного веретена деления, обеспечивающего расхождение хромосом по двум клеткам, триплоидные хромосомы могут разделиться по четырем клеткам, причем неравномерно, т. е. некоторые клетки мо-

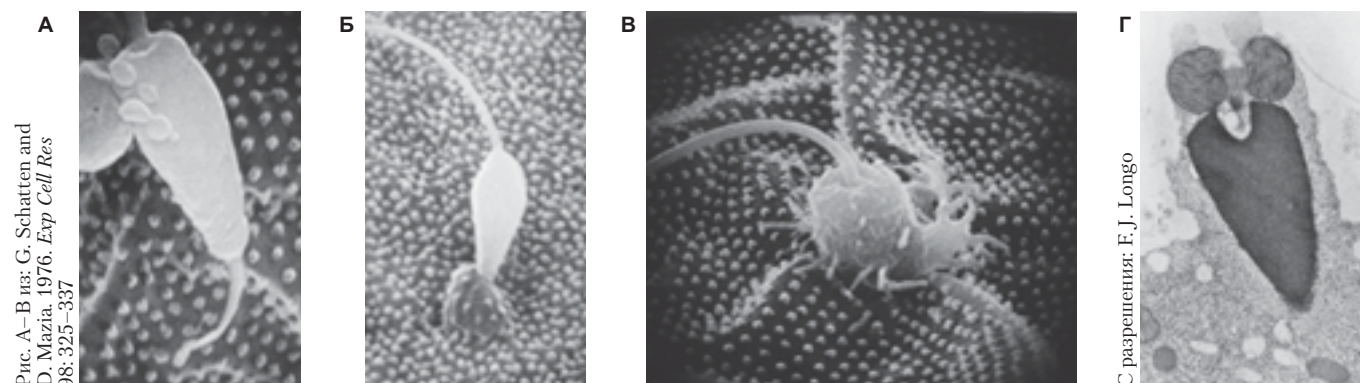


Рис. 7.11. Микрофотографии проникновения сперматозоидов внутрь яйцеклетки морского ежа, полученные на сканирующем электронном микроскопе. **А.** Контакт головки сперматозоида с микроворсинками яйцеклетки посредством акросомного выроста. **Б.** Образование воспринимающего бугорка (бугорка оплодотворения). **В.** Поглощение сперматозоида яйцеклеткой. **Г.** Микрофотография, полученная при помощи просвечивающего электронного микроскопа, демонстрирует проникновение сперматозоида через бугорок оплодотворения

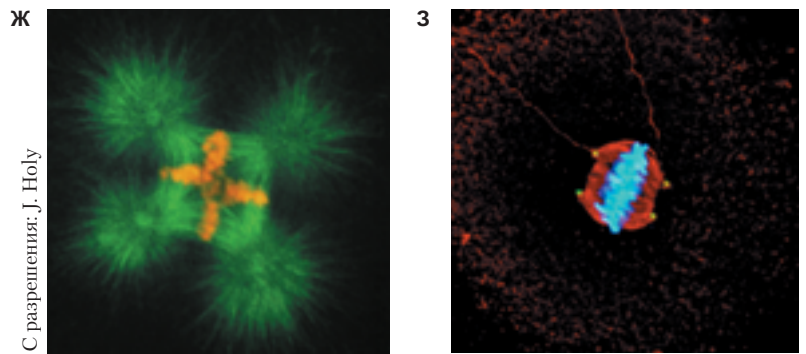
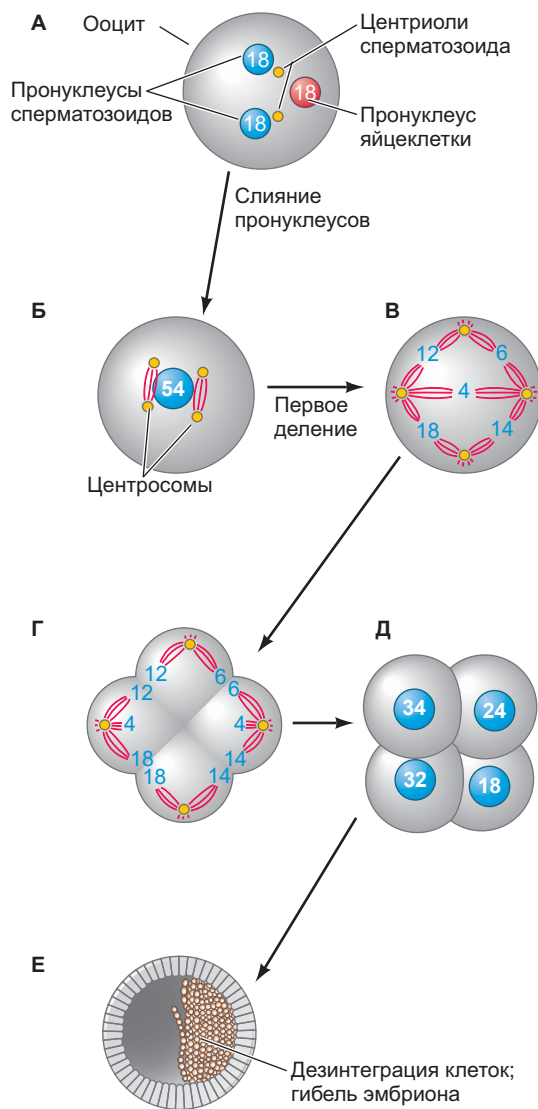


Рис. 7.12. Аномальное развитие яйцеклетки морского ежа, оплодотворенной двумя сперматозоидами. **А.** Слияние трех гаплоидных ядер, каждое из которых содержит 18 хромосом, и удвоение центриолей сперматозоидов с образованием четырех центросом (полюсов веретена деления). **Б, В.** 54 хромосомы случайным образом распределяются между четырьмя полюсами веретена деления. **Г.** Во время анафазы первого деления удвоенные хромосомы расходятся к четырем полюсам. **Д.** Образуется четыре клетки с различным числом и типом хромосом, что приводит (**Е**) к ранней гибели эмбриона. **Ж.** Метафаза первого деления яйцеклетки морского ежа, оплодотворенной двумя сперматозоидами, напоминает картину, показанную на рис. 7. Микротрубочки окрашены в зеленый цвет, ДНК — в оранжевый. ДНК разделяется между четырьмя клетками с различным числом хромосом, вместо того чтобы разделить между двумя клетками с одинаковым набором хромосом. **З.** Яйцеклетка человека, оплодотворенная двумя сперматозоидами, во время первого деления митоза. Четыре центриолы окрашены в желтый цвет, в то время как микротрубочки веретена деления (и микротрубочки из хвостов двух сперматозоидов) окрашены в красный. Три набора хромосом, разделенные между четырьмя полюсами веретена деления, показаны голубым. (Рис. А–Е по данным: Т. Boveri, 1907. *Jena Z Naturwiss* 43: 1–292.)

гут получить дополнительные копии одних и тех же хромосом, в то время как другие вообще останутся без них (**рис. 7.12**). Теодор Бовери в 1902 г. показал, что такие клетки либо погибают, либо развиваются аномально.

БЫСТРЫЙ БЛОК ПОЛИСПЕРМИИ

Самый простой способ предотвращения слияния более чем двух гаплоидных ядер — ограничение проникновения более одного сперматозоида в яйцеклетку. Разработаны различные механизмы предотвращения полиспермии, два из которых реализованы в яйцеклетках морского ежа. Первая и быстро развивающаяся реакция осуществляется благодаря изменению потенциала на мембране яйцеклетки, далее она сменяется развитием более медленных процессов, связанных с экзоцитозом кортикальных гранул (Just, 1919).

Быстрый блок полиспермии достигается за счет изменения электрического потенциала на мембране яйцеклетки, которое происходит сразу после проникновения сперматозоида. Исходный потенциал покоя на мембране яйцеклетки составляет около 70 мВ, что выражается как -70 мВ, поскольку *внутренняя часть заряжена отрицательно по отношению к внешней стороне*. Однако химические вещества, поступающие из цитоплазмы сперматозоида при слиянии с яйцеклеткой, оказывают влияния на натриевые (Na^+) каналы в мембране яйцеклетки (McCulloh and Chambers, 1992; Wong and Wessel, 2013). В течение 1–3 с после проникновения первого сперматозоида потенциал на мембране становится положительным — около $+20$ мВ (по отношению к внешней стороне) (**рис. 7.13А**; Jaffe, 1980; Longo et al., 1986). Сперматозоиды не могут сливаться с мембраной яйцеклетки, имеющей положительный потенциал покоя, таким образом, переход от отрицательного значения потенциала покоя к положительному

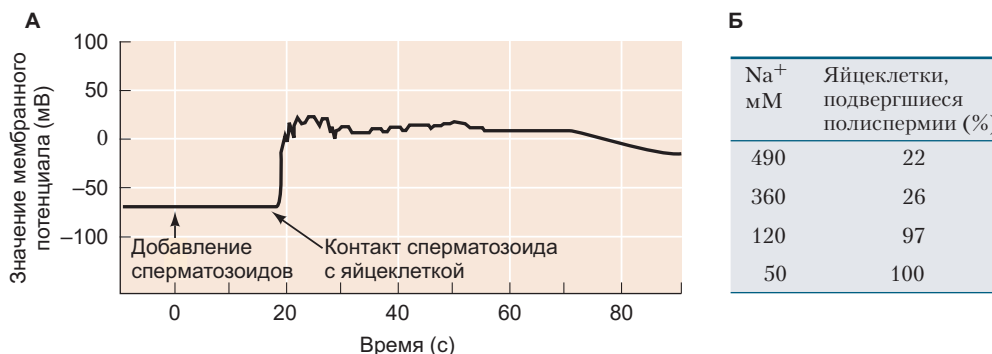


Рис. 7.13. Мембранный потенциал яйцеклетки морского ежа до и после оплодотворения. **А.** До добавления сперматозоидов значение мембранного потенциала составляло около -70 мВ. В течение 1–3 с после контакта сперматозоида с яйцеклеткой значение мембранного потенциала сдвигается в положительную сторону. **Б.** Таблица, отражающая повышение уровня полиспермии при уменьшении концентрации ионов Na^+ . В морской воде концентрация ионов Na^+ составляет около 600 мМ. (По данным: L. A. Jaffe, 1980. *Dev Growth Diff* 22: 503–507.)

означает, что дополнительные сперматозоиды больше не сольются с яйцеклеткой.

Роль ионов натрия (Na^+) и изменение потенциала покоя с отрицательного на положительный были показаны Лауриндой Яффе и ее коллегами. Они обнаружили, что полиспермия имеет место, если при помощи электрического тока искусственно поддерживать отрицательные значения потенциала на мембране яйцеклетки. И наоборот, оплодотворение может быть полностью предотвращено, если искусственно поддерживать положительные значения потенциала покоя (Jaffe, 1976). Быстрый блок полиспермии можно обойти путем снижения концентрации ионов Na^+ в воде, в которую поместили яйцеклетки (рис. 7.13Б). Если концентрация ионов Na^+ недостаточна для того, чтобы вызвать изменение значения потенциала, происходит полиспермия (Gould-Somero et al., 1979; Jaffe, 1980). Связанный с потенциалом блок полиспермии встречается также у лягушек (Cross и Elinson, 1980; Iwao et al., 2014), но, вероятно, отсутствует у большинства млекопитающих (Jaffe and Cross, 1983).



Загадки развития

Ионы натрия могут способствовать развитию быстрого блока полиспермии в соленой морской воде. Но амфибии, нерестящиеся в пресных водоемах, тоже используют ионные каналы для предотвращения полиспермии. Как это достигается в условиях, когда концентрация ионов натрия отличается от океанической?

МЕДЛЕННЫЙ БЛОК ПОЛИСПЕРМИИ

Быстрый блок полиспермии является кратковременным, так как мембранный потенциал яйцеклетки морского ежа остается положительным только в те-

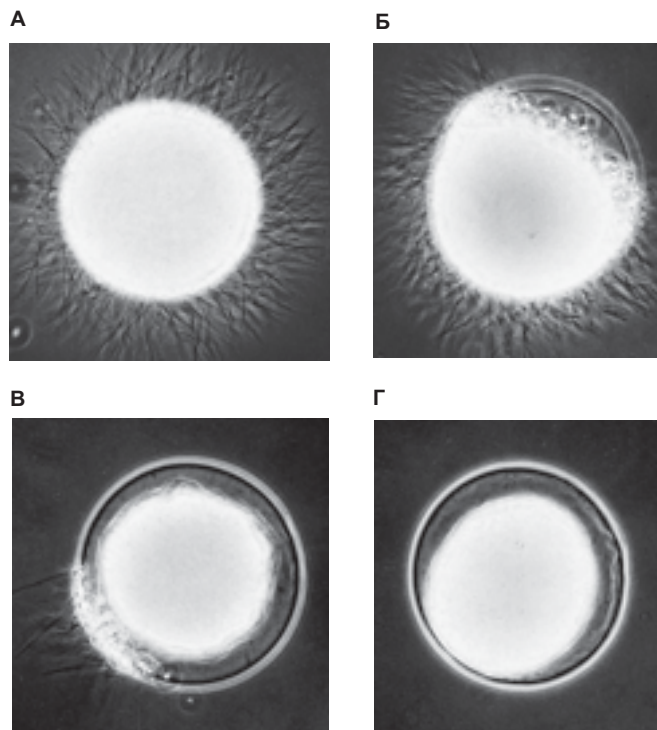
чение минуты. Такого короткого сдвига значения потенциала недостаточно для постоянного предотвращения полиспермии, которая может произойти, если сперматозоиды, связавшиеся с желточной оболочкой, не будут с нее удалены (Carroll и Epel, 1975). Очищение оболочки от сперматозоидов происходит во время **кортикальной гранулярной реакции**, известной также как **медленный блок полиспермии**. Эта реакция активируется примерно через минуту после успешного слияния первого сперматозоида с яйцеклеткой (Just, 1919). Медленный блок полиспермии характерен для многих видов животных, включая большинство млекопитающих.

Непосредственно под мембраной яйцеклетки содержится около 15 000 кортикальных гранул, каждая диаметром около 1 мкм (см. рис. 7.4Б). После проникновения сперматозоида кортикальные гранулы сливаются с мембраной яйцеклетки и происходит высвобождение их содержимого в пространство между мембраной и желточной оболочкой. В результате экзоцитоза кортикальных гранул выделяется несколько белков. Среди них сериновая протеаза, фермент, который разрушает белковые столбики, связывающие желточную оболочку с мембраной яйцеклетки. Кроме того, он отрезает рецепторы биндина вместе со сперматозоидами, которые провзаимодействовали с ними (Vacquier et al., 1973; Glabe and Vacquier, 1978; Haley and Wessel, 1999, 2004).

Содержимое кортикальных гранул связывается желточной оболочкой, что приводит к формированию оболочки оплодотворения. Последняя начинает образовываться в месте вхождения сперматозоида и потом распространяется по поверхности яйцеклетки. Этот процесс начинается примерно через 20 с после прикрепления сперматозоида и завершается к концу первой минуты после оплодотворения (рис. 7.14; Wong and Wessel, 2004, 2008).

Оболочка оплодотворения отделяется от мембраны яйцеклетки благодаря гликозамингликанам, вы-

Рис. 7.14. Образование оболочки оплодотворения и удаление лишних сперматозоидов. Для получения этих фотографий к яйцеклеткам морского ежа добавляли суспензию сперматозоидов, а затем образец фиксировали параформальдегидом для предотвращения дальнейших реакций. **А.** Через 10 с после внесения суспензии спермы сперматозоиды окружают яйцеклетку. Через 25 с (**Б**) и 35 с (**В**) после оплодотворения вокруг яйцеклетки образуется оболочка оплодотворения, начиная от места вхождения сперматозоида. **Г.** Оплодотворение завершено, лишние сперматозоиды удалены



V. D. Vacquier and J. E. Payne, 1973.
Exp Cell Res 82: 227–235, с разрешения V. D. Vacquier

делившимся из кортикальных гранул. Эти вязкие соединения впитывают воду, расширяя пространство между мембраной и оболочкой оплодотворения, так что оболочка перемещается радиально от яйцеклетки. Затем происходит стабилизация оболочки оплодотворения путем сшивания белков при помощи специфичных для яйцеклетки ферментов пероксидазы и транслугаминазы, которые также высвобождаются из кортикальных гранул (рис. 7.15; Foerder and Shapiro, 1977; Wong et al., 2004; Wong and Wessel, 2009). Сшивание позволяет яйцеклетке и раннему эмбриону противостоять воздействию океанических приливных волн. Еще один, четвертый, тип белков, содержащийся в кортикальных гранулах, в частности гиалин, формирует слой на поверхности яйцеклетки (Nylander и Summers, 1982). Яйцеклетка кончиками удлиненных микроворсинок присоединяется к этому гиалиновому слою, что обеспечивает поддержку blastomerov во время дробления.

ИОНЫ КАЛЬЦИЯ КАК ИНИЦИАТОРЫ КОРТИКАЛЬНОЙ РЕАКЦИИ

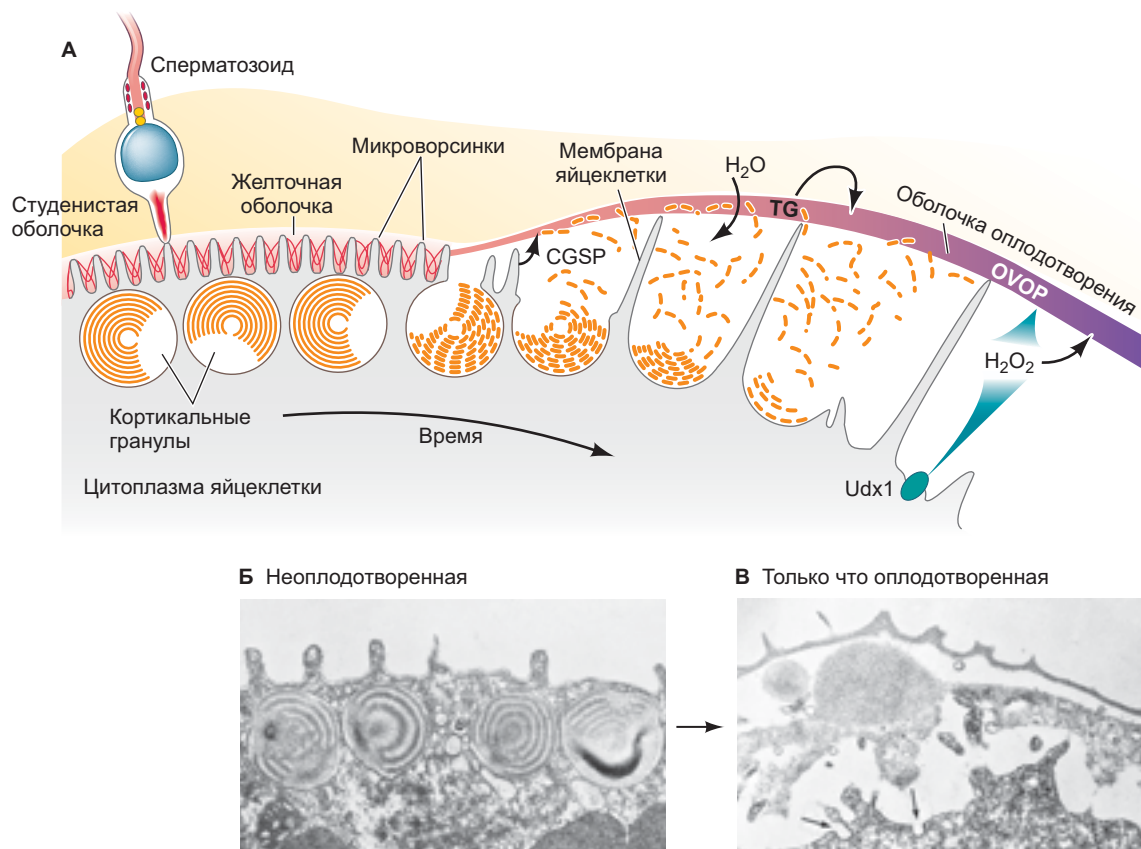
Механизм экзоцитоза кортикальных гранул схож с механизмом экзоцитоза акросомы, в него вовлечено множество молекул. После оплодотворения концентрация свободных ионов кальция (Ca^{2+}) в цитоплазме яйцеклетки существенно возрастает. В условиях высокой концентрации кальция мембраны кортикальных гранул сливаются с мембраной яйцеклетки, высвобождая содержимое гранул (рис. 7.15А). После начала слияния мембран кортикальных гранул с мембраной яйцеклетки в точке

вхождения сперматозоида начинается распространение волны экзоцитоза гранул по всей поверхности яйцеклетки.

У морских ежей и млекопитающих повышение концентрации ионов Ca^{2+} , необходимое для запуска кортикальной реакции, происходит не из-за притока ионов в яйцеклетку снаружи, а из-за выхода ионов из эндоплазматического ретикулума внутри яйцеклетки (Eisen и Reynolds, 1985; Terasaki и Sardet, 1991). Высвобождение ионов кальция из внутриклеточного хранилища можно наблюдать визуально при использовании люминисцентных красителей, активируемых кальцием, например экворина (белка, который, как и GFP, был выделен из люминесцирующих медуз) или флуоресцентных красителей, таких как fura-2. Красители начинают светиться при связывании со свободными ионами Ca^{2+} . Когда в яйцеклетку морского ежа вводят краситель, а затем оплодотворяют ее, по цитоплазме распространяется волна высвобождения кальция, что выглядит как полоса света, формирующаяся у места вхождения сперматозоида и активно перемещающаяся на другой конец клетки (рис. 7.16; Steinhardt et al., 1977; Hafner et al., 1988). Полное высвобождение ионов кальция заканчивается примерно через 30 с, и происходит их обратное депонирование вскоре после высвобождения.

Активация метаболизма яйцеклетки морского ежа

Хотя оплодотворение часто описывают исключительно как слияние двух гаплоидных ядер, не менее



Из: D. E. Chandler and J. Heuser. 1979. *J Cell Biol* 83: 91–108, с разрешения D. E. Chandler

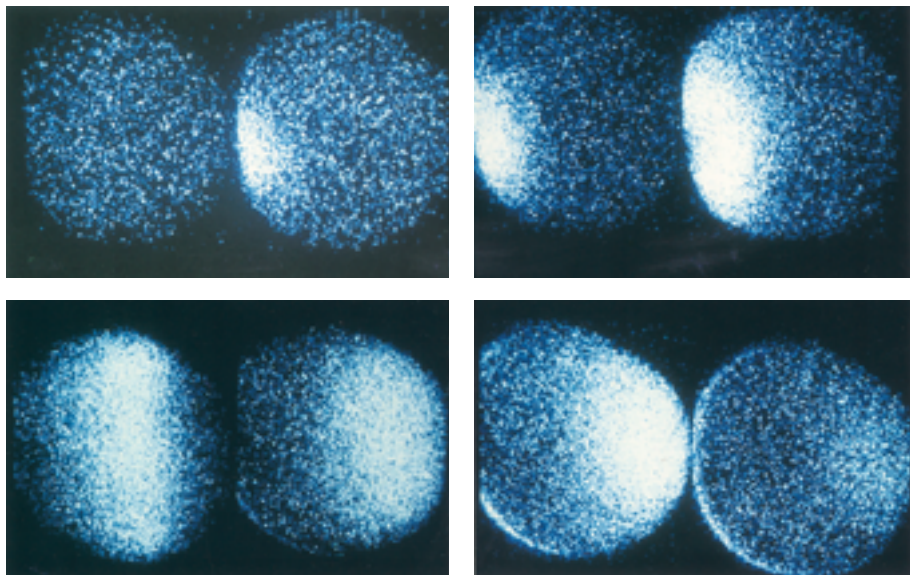
Рис. 7.15. Экзоцитоз кортикальных гранул и формирование оболочки оплодотворения у морского ежа. **А.** Схематично показаны события, приводящие к формированию оболочки оплодотворения. При экзоцитозе кортикальных гранул происходит высвобождение сериновой протеазы (CGSP) — фермента, который расщепляет белки, связывающие желточную оболочку с мембраной яйцеклетки. Гликозаминогликаны, также высвобождаемые из кортикальных гранул, образуют осмотический градиент, что приводит к поступлению воды и расширению пространства между желточной оболочкой и мембраной. Фермент Udx1, расположенный в остатках мембраны кортикальных гранул, катализирует образование пероксида водорода (H_2O_2) — субстрата для овопероксидазы (OVOP). OVOP и трансклутаминаза (TG) вызывают затвердевание желточной оболочки, которая теперь называется оболочкой оплодотворения. Микрофотографии кортикальной зоны неоплодотворенной (**Б**) и того же участка только что оплодотворенной (**В**) яйцеклетки морского ежа, полученные при помощи просвечивающего электронного микроскопа (масштаб совпадает). Отхождение оболочки оплодотворения и место слияния кортикальных гранул с мембраной яйцеклетки (показано стрелками) (**В**). (Рис. А по данным: L. Wong and G. M. Wessel, 2008. *Development* 135: 431–440.)

важна активация процессов, имеющих место в начале развития. Все они идут в цитоплазме без вовлечения родительских ядер. В дополнение к активации медленного блока полиспермии (посредством экзоцитоза кортикальных гранул) высвобождение ионов Ca^{2+} , происходящее после проникновения сперматозоида, является исключительно важным событием для активации метаболизма яйцеклетки и запуска процессов дальнейшего развития нового организма. Ионы кальция снимают ингибирование мРНК, способствуя началу трансляции, кроме того, они снимают ингибирование деления ядра, вызывая таким образом дробление. Во всем животном мире

ионы Ca^{2+} участвуют в активации развития в ходе оплодотворения.

Фосфолипаза С: фактор образования IP_3 . IP_3 необходим для высвобождения ионов кальция, а фосфолипаза С (PLC) — для образования IP_3 , однако возникает вопрос, что приводит к активации PLC? Результаты экспериментов и анализ фосфорилирования белка позволяют предположить, что в яйцеклетках морского ежа в процессе активации PLC принимают участие мембранно-связанные киназы (Src-киназы) и ГТФ-связывающие белки, которые активируются при контакте или слиянии сперматозоида с яйцеклеткой (**рис. 7.19**; Kinsey and Shen, 2000;

Рис. 7.16. Распространение ионов Ca^{2+} в яйцеклетке морского ежа во время оплодотворения. В яйцеклетку предварительно был введен краситель, который флуоресцирует, связываясь с Ca^{2+} . Когда сперматозоид сливается с яйцеклеткой, от места его вхождения по цитоплазме яйцеклетки начинает распространяться волна высвобождения Ca^{2+} . Изображения получены с интервалом в 3 с и представлены от более ранних событий к более поздним слева направо. Кальциевая волна не просто рассеивается, но активно распространяется по яйцеклетке, общее время прохождения волны — 30 с



M. Hafner et al., 1988. *Cell Motil Cytoskeleton* 9: 271–277, с разрешения G. Schatten

Giusti et al., 2003; Voronina and Wessel, 2004; Townley et al., 2009; Guo et al., 2015).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

Способ высвобождения Ca^{2+} у отдельных видов животных различается (Parrington et al., 2007).

Существование одного из способов было впервые предложено Жаком Лебом (Jacques Loeb, 1899, 1902): растворимый фактор, содержащийся в сперматозоиде, вводится в яйцеклетку, в результате чего происходят изменение ионного состава цитоплазмы и активация яйцеклетки (**рис. 7.17А**). Данный механизм, как мы увидим ниже, вероятно, имеет место у млекопитающих. Другой механизм был предложен конкурентом Леба Франком Лилли

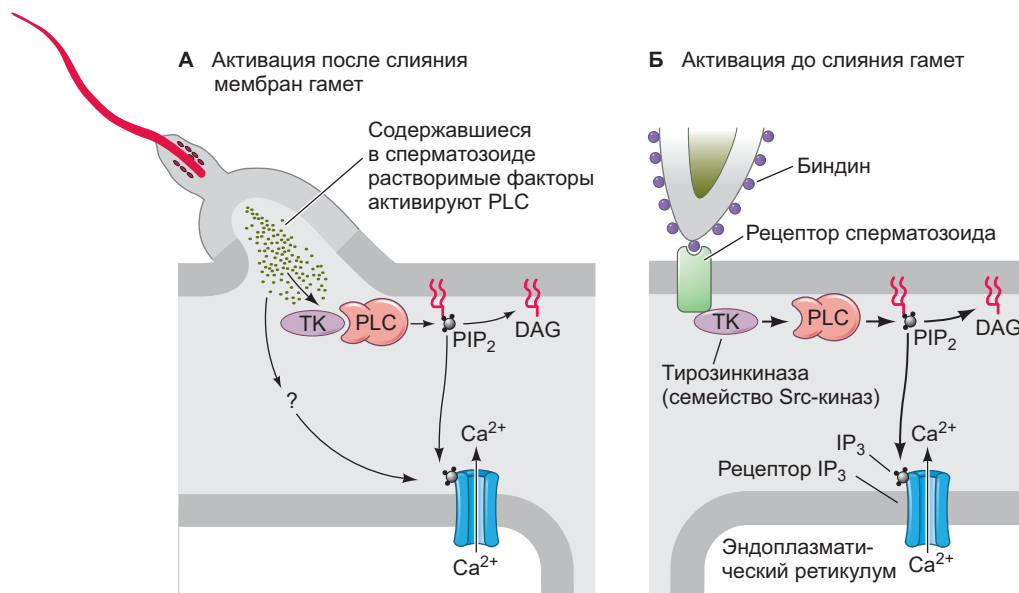


Рис. 7.17. Вероятные механизмы активации яйцеклетки. В обоих случаях фосфолипаза C (PLC) активируется и вызывает образование IP_3 и диацилглицерола (DAG). **А.** Высвобождение ионов Ca^{2+} и активация яйцеклетки фосфолипазой C, поступающей непосредственно из сперматозоида, или фосфолипазой яйцеклетки, активированной веществом, поступающим из сперматозоида. Вероятно, данные процессы характерны для млекопитающих. **Б.** Рецептор белка биндина, возможно, действующий через G-белок, активирует тирозинкиназу (ТК, из семейства Src-киназ), которая в свою очередь активирует PLC. Данный механизм, по всей видимости, характерен для морских ежей

(Frank Lillie, 1913), он заключается в том, что сперматозоид связывается с рецепторами на поверхности яйцеклетки и изменяет их конформацию, запуская этим в цитоплазме реакции активации яйцеклетки (рис. 7.17Б). Такой сценарий, вероятно, реализуется у морских ежей.

IP₃: высвобождающий Ca²⁺ фактор. Ионы кальция, высвобождающиеся из эндоплазматического ретикулума, ответственны за развитие кортикальной реакции и активацию процессов развития, но что же способствует их высвобождению? Было показано, что у всех представителей животного мира основным фактором, вызывающим внутриклеточный выброс Ca²⁺, является **инозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃)**. Инозитолфосфатный путь представлен на **рис. 7.18**. Через несколько секунд после контакта сперматозоида и яйцеклетки IP₃ обнаруживается в области контакта. Ингибирование синтеза IP₃ предотвращает высвобождение ионов кальция из эндоплазматического ретикулума (Lee and Shen, 1998; Carroll et al., 2000), а инъекция IP₃ в неоплодотворенную яйцеклетку приводит к высвобождению Ca²⁺ и экзоцитозу кортикальных гранул (Whitaker and Irvine, 1984).

ВЛИЯНИЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ КАЛЬЦИЯ

Прохождение волны Ca²⁺ по яйцеклетке (**рис. 7.19**) приводит к активации заранее запрограммированного набора метаболических событий. Реакции яйцеклетки морского ежа на взаимодействие со сперматозоидом можно разделить на ранние, т. е. развивающиеся в течение нескольких секунд после прохождения кортикальной реакции, и поздние, которые запускаются через несколько минут после оплодотворения (**табл. 7.1**).

Ранние реакции. Как мы обсуждали выше, контакт или слияние сперматозоида с яйцеклеткой морского ежа приводит к развитию двух блоков полиспермии: быстрого, опосредованного поступлением ионов натрия в клетку, и медленного, называемого кортикальной реакцией и связанного с внутриклеточным высвобождением ионов кальция. Эти же ионы кальция запускают восстановление клеточного цикла и синтеза белков в яйцеклетке. Концентрация кальция в ней меняется в диапазоне от 0,05 до 1 и даже 5 мкМ, и практически у всех видов животных этот процесс носит волнообразный характер, распространение волны или волн начинается от места вхождения сперматозоида (рис. 7.16; Jaffe, 1983; Terasaki and Sardet, 1991; Stricker 1999).

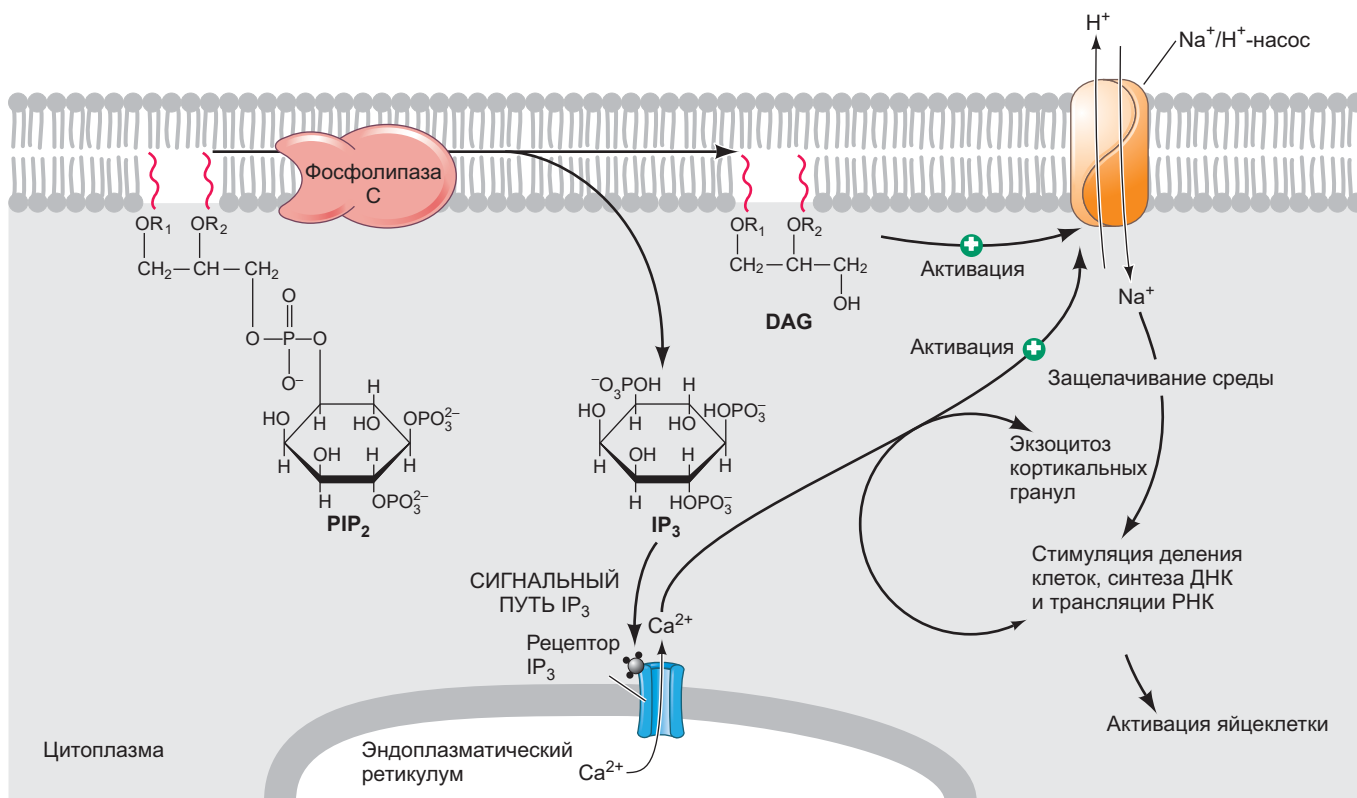
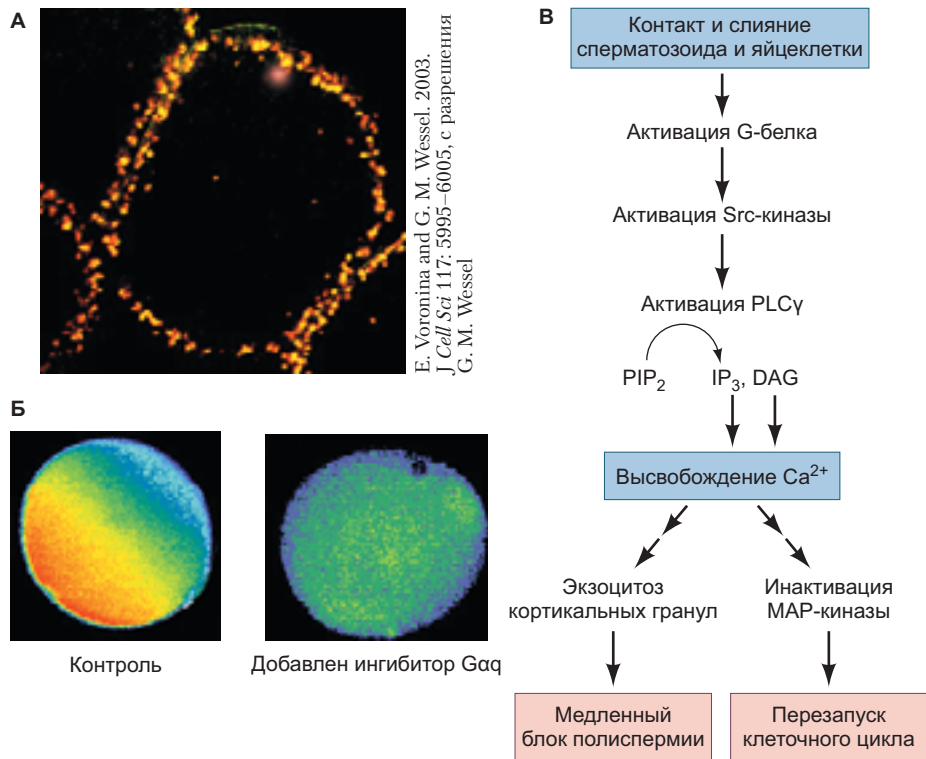


Рис. 7.18. Функции инозитолфосфатов в высвобождении Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума и в инициации процессов развития. Фосфолипаза С расщепляет PIP₂ (фосфатидинозитол-4,5-бисфосфат) на IP₃ и DAG. IP₃ вызывает выход ионов Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума, а DAG при помощи высвобожденных Ca²⁺ активирует Na⁺/H⁺-насос в мембране яйцеклетки

Рис. 7.19. Участие G-белка в поступлении ионов Ca^{2+} в яйцеклетку морского ежа. **А.** Зрелая яйцеклетка морского ежа, иммуноцитохимическое окрашивание на белок кортикальных гранул — гиалин (красный цвет) и G-белок $\text{G}\alpha\text{q}$ (зеленый цвет). Пересечение сигналов дает желтый цвет. $\text{G}\alpha\text{q}$ располагается в кортексе. **Б.** Волна распространения Ca^{2+} появляется в яйцеклетке из группы контроля (компьютерная обработка изображения, показывающая изменение интенсивности, красным цветом показан самый высокий уровень), но не в яйцеклетке, в которую инъецировали ингибитор белка $\text{G}\alpha\text{q}$. **В.** Вероятная модель активации яйцеклетки при поступлении Ca^{2+}



Поздние реакции: возобновление синтеза белков и ДНК. Выход ионов кальция в цитоплазму яйцеклетки активирует ряд метаболических реакций, запускающих эмбриональное развитие (рис. 7.20). Одним из таких процессов является активация фермента NAD^+ -киназы, которая превращает NAD^+ в NADP^+ (Epel et al., 1981). Только NADP^+ , но не NAD^+ , выступает в качестве кофермента при биосинтезе липидов, поэтому такое превращение играет важную роль в метаболизме липидов и построении новых мембран, что необходимо при дроблении. Фермент

Udx1, отвечающий за превращение молекулярного кислорода в пероксид водорода для того, чтобы произошло сшивание оболочки оплодотворения, также NADPH -зависим (Heinecke and Shapiro, 1989; Wong et al., 2004). Наконец, NADPH помогает восстановить глутатион и овотиолы — молекулы, связывающие свободные радикалы, способные повредить ДНК яйцеклетки и раннего эмбриона (Mead and Epel, 1995).

Считается, что повышение концентрации Ca^{2+} и значения pH (в связи с выходом из клетки ионов H^+ и поступлением Na^+ из морской воды) совместно

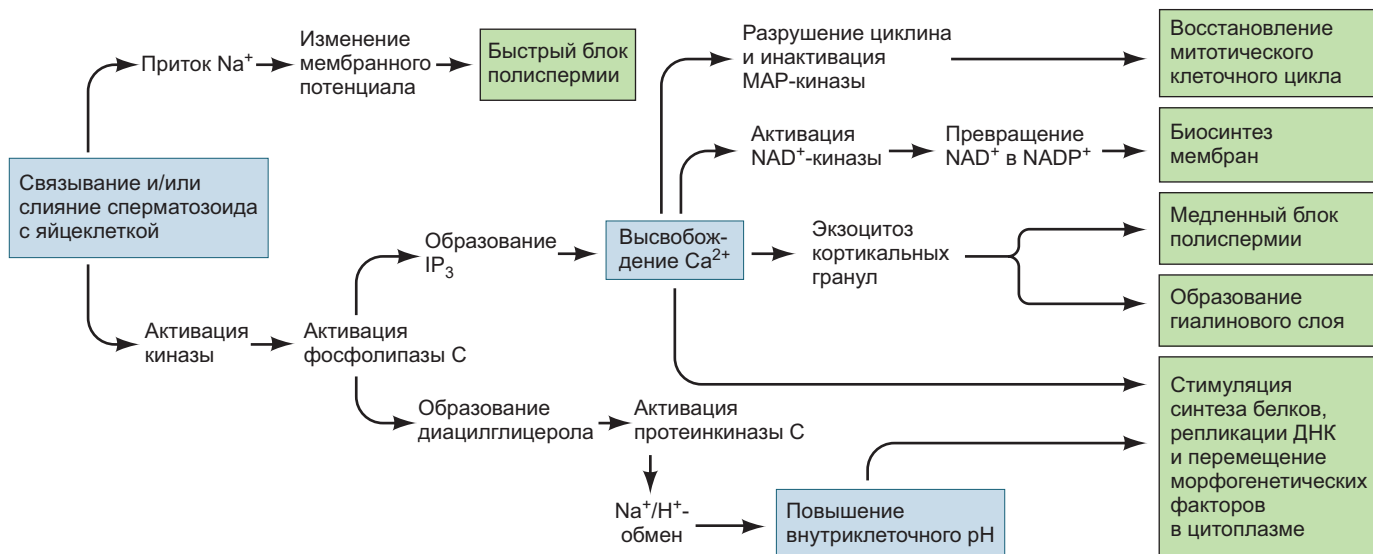


Рис. 7.20. Предполагаемый путь активации яйцеклетки морского ежа. (По данным: D. Epel, 1980, *Endeavour* N. S. 4: 26–31 и L. A. Jaffe, личное сообщение)

ТАБЛИЦА 7.1. События, имеющие место при оплодотворении морского ежа

Событие	Примерное время, прошедшее после осеменения
РАННИЕ РЕАКЦИИ	
Связывание сперматозоида с яйцеклеткой	0 с
Повышение потенциала при оплодотворении (быстрый блок полиспермии)	в течение 3 с
Слияние мембран сперматозоида и яйцеклетки	в течение 1 с
Первое зарегистрированное повышение концентрации Ca^{2+}	10 с
Экзоцитоз кортикальных гранул (медленный блок полиспермии)	15–60 с
ПОЗДНИЕ РЕАКЦИИ	
Активация NAD-киназы	Начинается на 1-й мин
Повышение уровня NADP^+ и NADPH	Начинается на 1-й мин
Повышение уровня потребления кислорода	Начинается на 1-й мин
Вхождение сперматозоида	1–2 мин
Отток кислоты	1–5 мин
Повышение уровня pH (остается высоким)	1–5 мин
Деконденсация хроматина сперматозоида	2–12 мин
Перемещение ядра сперматозоида к центру яйцеклетки	2–12 мин
Перемещение ядра яйцеклетки к ядру сперматозоида	5–10 мин
Активация синтеза белков	Начинается на 5–10-й мин
Активация транспорта аминокислот	Начинается на 5–10-й мин
Начало синтеза ДНК	20–40 мин
Митоз	60–80 мин
Первое деление дробления	85–95 мин

Источники: M. J. Whitaker and R. A. Steinhardt, 1985. *Q Rev Biophys* 15: 593–667; T. Mohri et al., 1995. *Dev Biol* 172: 139–157.

Приблизительное время указано для следующих видов: *S. purpuratus* (15–17 °C), *L. pictus* (16–18 °C), *A. punctulata* (18–20 °C) и *L. variegatus* (22–24 °C). Время наступления событий в течение первой минуты наиболее подробно описано для *L. variegatus*, поэтому в таблице указано характерное время для этого вида.

стимулируют синтез новой ДНК и белков (Winkler et al., 1980; Whitaker and Steinhardt, 1982; Rees et al., 1995). Если искусственно повысить pH в неоплодотворенной яйцеклетке до уровня, характерного для оплодотворенной, запускается процесс синтеза ДНК и начинается разрушение ядерной оболочки, как в случае если бы яйцеклетка была оплодотворена (Miller and Epel, 1999). Ионы Ca^{2+} тоже необходимы для синтеза ДНК. Распространяющаяся волна Ca^{2+} инактивирует фермент MAP-киназу, переводя ее из фосфорилированного (активного) в нефосфорилированное (неактивное) состояние, снимая ингибирование синтеза ДНК (Carroll et al., 2000). После прохождения кальциевой волны синтез ДНК может быть возобновлен.

У морских ежей активация синтеза белка обычно происходит через несколько минут после проникновения сперматозоида. Эти процессы синтеза белка

не связаны с синтезом новой мРНК, так как в них идет использование заранее накопленных в цитоплазме ооцита мРНК. Накопленные мРНК кодируют такие белки, как белки-регуляторы клеточного цикла, факторы транскрипции, гистоны, тубулины и актины, которые будут использованы на самых ранних стадиях развития. Активация синтеза белка может быть искусственно вызвана путем повышения pH цитоплазмы с помощью ионов аммония (Sargent and Raff 1976; Winkler et al., 1980; Chassé et al., 2018).

Один из механизмов общего увеличения трансляции накопленных в ооците мРНК — освобождение мРНК от ингибиторов. Маскин — ингибитор трансляции в неоплодотворенном ооците амфибий. У морских ежей подобный ингибитор действует схожим образом, предотвращая трансляцию нескольких мРНК. Однако при оплодотворении он фосфорилируется и разрушается, благодаря чему трансляция

и синтез белка могут возобновиться (Cormier et al., 2001; Oulhen et al., 2007). Одной из «освобожденных» мРНК является матрица, кодирующая циклин Б (Salaun et al., 2003, 2004). Этот белок вместе с Cdk1 формирует фактор, стимулирующий митоз (MPF), необходимый для запуска деления клеток.

Объединение генетического материала морских ежей

После слияния мембран сперматозоида и яйцеклетки ядро сперматозоида и его центриоль отделяются от митохондрий и жгутика. Митохондрии и жгутик разрушаются внутри яйцеклетки, поэтому крайне редко митохондрии, полученные от сперматозоида, могут быть обнаружены в развивающихся или взрослых организмах. Таким образом, каждая гамета вносит гаплоидный набор генов в зиготу, а митохондрии наследуются главным образом от матери. И наоборот, почти у всех видов животных, за исключением мышей, центросома, необходимая для образования веретена деления, происходит из центриоли сперматозоида (см. рис. 7.12; Sluder et al., 1989, 1993).

Оплодотворение яйцеклетки морского ежа наступает после завершения второго деления мейоза, поэтому в яйцеклетке содержится гаплоидное ядро, когда сперматозоид входит в цитоплазму. После проникновения внутрь яйцеклетки ядро сперматозоида претерпевает существенные изменения — деконденсацию хроматина при превращении в мужской пронуклеус. Во-первых, происходит разрушение оболочки ядра, что приводит к контакту компактизированного хроматина сперматозоида с цитоплазмой яйцеклетки (Longo and Kunkle, 1978; Poccia and Collas, 1997). Киназы, содержащиеся в цитоплазме яйцеклетки, фосфорилируют специфичные для сперматозоидов гистоновые белки, что приводит к деконденсации. Фосфорилированные гистоны сперматозоидов впоследствии заменяются на гистоны, полученные из яйцеклетки, которые будут функционировать при дроблении (Stephens et al., 2002; Morin et al., 2012). После деконденсации ДНК прикрепляется к новообразованной оболочке ядра, синтезированной из предшественников и эндоплазматического ретикулума,

а ДНК-полимераза запускает репликацию (Infante et al., 1973).

Каким образом пронуклеусы сперматозоида и яйцеклетки находят друг друга? Как только сперматозоид морского ежа входит в цитоплазму яйцеклетки, и его ядро отделяется от хвоста, оно разворачивается на 180°, центриоль сперматозоида располагается между формирующимися мужским и женским пронуклеусами. Впоследствии центриоль выполняет функцию центра организации микротрубочек,

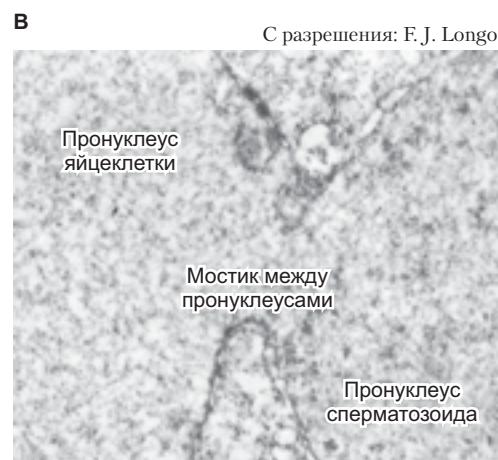
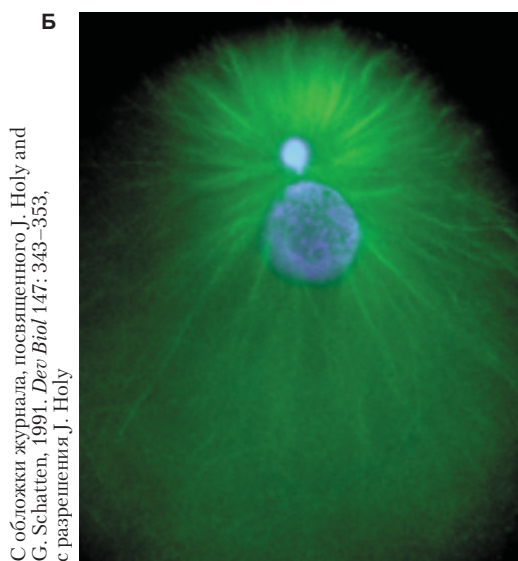
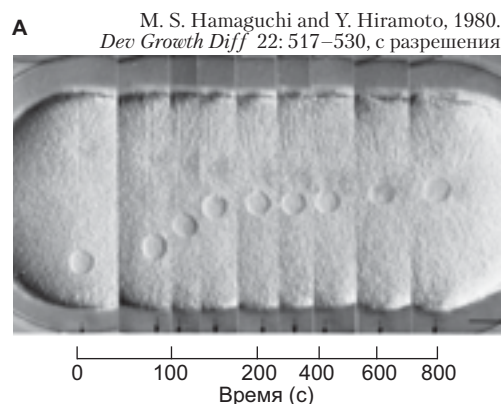


Рис. 7.21. События, отражающие поведение ядер при оплодотворении морского ежа. **A.** Последовательные кадры, показывающие перемещение пронуклеусов яйцеклетки и сперматозоида по отношению друг к другу в цитоплазме яйцеклетки *Chelyaster japonicus*. Мужской пронуклеус окружен астральными микротрубочками. **Б.** Два пронуклеуса движутся навстречу друг другу вдоль микротрубочек. (ДНК окрашена в *синий цвет* красителем Hoechst.) Микротрубочки (окрашены в *зеленый цвет* антителами против тубулина) расходятся от центросомы, связанной с (меньшим) мужским пронуклеусом, тянутся в сторону женского пронуклеуса. **В.** Слияние пронуклеусов в яйцеклетке морского ежа

распространяя собственные микротрубочки и объединяя их с микротрубочками яйцеклетки. Микротрубочки расходятся по всей яйцеклетке и достигают женского пронуклеуса, после чего оба пронуклеуса начинают перемещаться вдоль микротрубочек навстречу друг другу. После их встречи активируются ферменты, отвечающие за синтез специфических липидов, способствующих слиянию (Lete et al., 2017), в результате которого образуется диплоидное ядро зиготы (рис. 7.21). Синтез ДНК может начаться как на стадии пронуклеусов, так и после образования ядра зиготы, и этот процесс зависит от концентрации ионов Ca^{2+} , высвобожденных ранее при оплодотворении (Jaffe et al., 2001).

Таким образом, после формирования диплоидного ядра зиготы, начала синтеза ДНК и белков, удаления ингибиторов, препятствующих делению клеток, морской еж может приступить к формированию многоклеточного организма. Способы достижения многоклеточности у морского ежа будут описаны в гл. 10.

Внутреннее оплодотворение млекопитающих

Проникновение гамет в яйцевод: перемещение и капацитация

Изучение взаимодействия сперматозоидов и яйцеклеток млекопитающих до их вступления в контакт — крайне трудная задача. Одна из очевидных причин заключается в том, что у млекопитающих оплодотворение происходит внутри яйцеводов самки. Достаточно легко можно имитировать условия, в которых происходит оплодотворение у морского ежа, используя обычную или искусственную морскую воду, но до сих пор остается неизвестным точный компонентный состав среды, с которой сперматозоиды млекопитающих сталкиваются по мере продвижения к яйцеклетке.

С уверенностью можно утверждать, что половые пути самки — не пассивный канал, через который проходят сперматозоиды, а узкоспециализированный набор тканей, принимающих активное участие в регуляции транспорта и созревания как женских, так и мужских гамет. Для того чтобы попасть в ампулярную часть яйцевода, где происходит оплодотворение, сперматозоиды и яйцеклетки используют как биохимическое взаимодействие, так и масштабные физические силы (см. рис. 12.10).

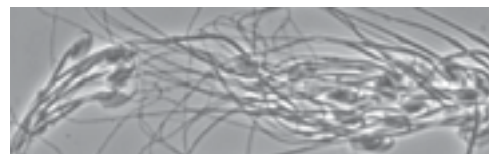
ПЕРЕМЕЩЕНИЕ

Женские половые пути облегчают встречу сперматозоида и яйцеклетки. Для позиционирования гамет в нужном месте в нужное время задействованы раз-

личные механизмы. Ооцит млекопитающих, только что вышедший из яичника, окружен клетками кумулюса, т. е. клетками овариального фолликула, в окружении которых развивался ооцит (см. рис. 7.5). Если кумулюсную оболочку удалить или существенно видоизменить, то ооцит-кумулюсный комплекс не будет захватывать ворсинки воронки яйцевода (см. рис. 12.10), следовательно, он не сможет попасть в яйцевод (Talbot et al., 1999). Как только ооцит-кумулюсный комплекс попадает в воронку яйцевода, благодаря согласованному биению ресничек и сокращению мышц он начинает перемещаться в сторону той части яйцевода, где будет проходить оплодотворение.

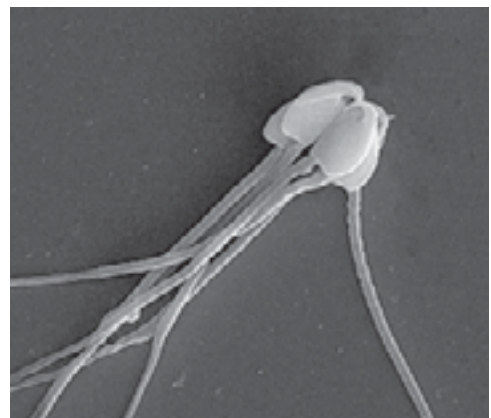
Сперматозоиды же должны пройти более длинный путь. У человека около 200–300 млн сперматозоидов оказывается во влагалище после того, как при половом контакте происходит эякуляция. Однако только один из миллиона попадает в яйцеводы (фаллопиевы трубы) (Harper, 1982; Cerezales et al., 2015). Половина сперматозоидов проникнет в «неправильный» яйцевод, тот, в котором нет яйцеклетки. Только около 200 сперматозоидов, вероятно, достигнет яйцеклетки. Перемещение сперматозоидов из влагалища в яйцевод включает несколько процессов, протекающих в разное время и в разных участках женских половых путей.

А



T. Pizzari and K. R. Foster, 2008. *PLOS Biol* 6: e130, с разрешения T. Pizzari and H. Moore CC BY 4.0

Б



С разрешения James Weaver, Wyss Institute, Harvard University

Рис. 7.22. Скопления сперматозоидов могут образовываться у видов, у которых самка спаривается с несколькими самцами за короткий промежуток времени. **А.** «Поезд сперматозоидов» европейской лесной мыши (*Apodemus sylvaticus*). Сперматозоиды соединены в области акросом. **Б.** Крупномасштабная фотография сперматозоидов полевой мыши *Peromyscus maniculatus*, соединенных крючков к крючку

• *Подвижность сперматозоидов.* Подвижность (биение жгутика), по всей видимости, необходима для проникновения сперматозоидов через цервикальную слизь в матку. Любопытно, что у тех млекопитающих, у которых самка спаривается с несколькими самцами в течение короткого промежутка времени, сперматозоиды одного и того же самца часто образуют «поезда» или скопления, в составе которых благодаря совместному биению жгутиков они перемещаются быстрее (рис. 7.22). Эта стратегия, вероятно, выработалась в результате конкуренции между самцами. У тех видов, у которых самка не отличается подобным поведением, сперматозоиды обычно остаются поодиночке (Fisher and Hockstra, 2010; Foster and Pizzari, 2010; Fisher et al., 2014).

• *Сокращение мышц матки.* Сперматозоиды могут быть обнаружены в яйцеводах мышей, хомяков, морских свинок, коров и людей через 30 мин после того, как они были помещены во влагалище. Это очень короткое время, «слишком короткое даже для сперматозоидов-олимпийцев, полагающихся только на биение собственных жгутиков» (Storey, 1995). Скорее всего, они перемещаются в яйцеводы при помощи сокращения мускулатуры матки.

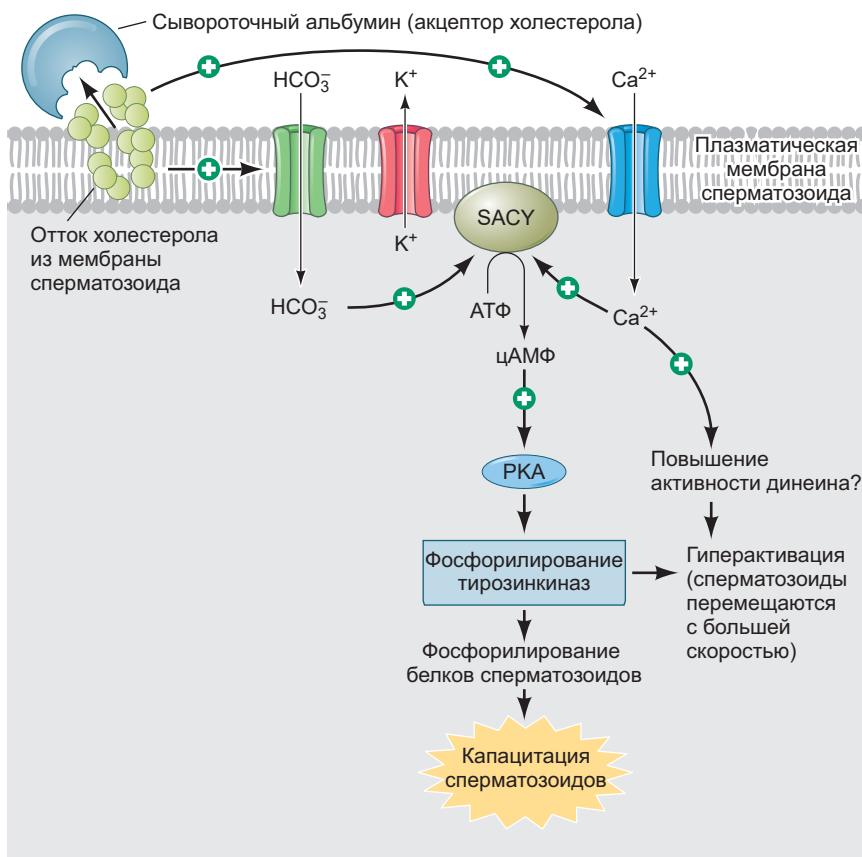
• *Реотаксис сперматозоидов.* Сперматозоиды получают сигналы от потока жидкости, направленного из яйцевода в сторону матки. Эти гаметы обладают **реотаксисом**, т. е. способностью перемещаться против направления тока жидкости, используя кальциевые каналы CatSper (как сперматозоиды морского

ежа) для определения направления притока кальция (Miki and Clapham 2013). Реотаксис был обнаружен у сперматозоидов мышей и людей.

КАПАЦИТАЦИЯ

Как было упомянуто в гл. 6, только что эякулированная сперма не может оплодотворить яйцеклетку. Такие сперматозоиды незрелые. Клетки яйцевода стимулируют их созревание т. е. сперматозоиды млекопитающих завершают свое развитие в половых путях самки (Chang, 1951; Austin, 1952). Созревание носит название **капацитация** (приобретение способности). Сперматозоиды приобретают «навыки»: 1) распознавания сигналов, которые направляют сперматозоиды к яйцеклетке; 2) прохождения акросомной реакции; 3) слияния с мембраной яйцеклетки. Некапацитированные сперматозоиды «застревают» в оболочке из клеток кумулюса и не могут достичь яйцеклетки (Austin, 1960; Corselli and Talbot, 1987). Это лишний раз подтверждает, что половые пути самки — не пассивные каналы, через которые проходят сперматозоиды. Капацитацию, вероятно, запускает удаление холестерина из мембраны сперматозоидов, вызванное белками, содержащимися в женском репродуктивном тракте. Изменения, связанные с демаскированием рецепторов на поверхности сперматозоидов, позволяют сперматозоиду связываться с *zona pellucida* и подготавливают акросому к акросомной реакции (рис. 7.23).

Рис. 7.23. Предполагаемая модель капацитации сперматозоидов млекопитающих. Данный путь переключается благодаря удалению холестерина из мембраны сперматозоида, что приводит к притоку ионов бикарбоната (HCO_3^-) и ионов Ca^{2+} . Ионы активируют аденилаткиназу (SACY), что приводит к повышению концентрации цАМФ. Высокая концентрация цАМФ необходима для активации протеинкиназы А (РКА). Активная РКА фосфорилирует несколько тирозинкиназ, которые в свою очередь фосфорилируют несколько белков сперматозоидов, что и приводит к капацитации. Повышение концентрации Ca^{2+} внутри клетки активирует фосфорилирование этих белков, а также способствует гиперактивации сперматозоидов. (По данным: P. E. Visconti et al., 2011. *Asian J Androl* 13: 395–405.)



Вблизи ооцита: гиперактивация, направленное движение сперматозоидов, акросомная реакция

ГИПЕРАКТИВАЦИЯ

После завершения капацитации сперматозоиды становятся **гиперактивными** — развивают большую скорость при движении. Гиперактивация, по-видимому, опосредована открытием специфичных кальциевых каналов — CatSper-белков в хвостовой части сперматозоида (рис. 7.23; Ren et al., 2001; Qui et al., 2007). В результате изменяется характер биения жгутика, его изгибы становятся более высокоамплитудными. Сила биения жгутика и направление движения головки сперматозоида считают определяющими при освобождении сперматозоида от связывания с эпителиальными клетками яйцевода. Действительно, только гиперактивные сперматозоиды могут открепиться от эпителия и продолжить движение к яйцеклетке (Suarez, 2008a, b). Гиперактивация позволяет также сперматозоидам по-разному реагировать на ток жидкости. Некапацитированные клетки движутся планарно (в одной плоскости), в результате чего у головки сперматозоида в распоряжении оказывается больше времени для того, чтобы прикрепиться к эпителию яйцевода (рис. 7.24). Капацитированные сперматозоиды совершают вращательные движения

? Загадки развития

Иногда яйцеклетка и сперматозоид не встречаются и оплодотворение не происходит. Каковы основные причины бесплодия у людей и какие процедуры используют для преодоления этих проблем?

вокруг своей длинной оси, что, вероятно, облегчает открепление сперматозоида от эпителиальных клеток (Miki and Clapham, 2013). Как только сперматозоид достигает ооцит-кумулюсного комплекса, гиперактивация совместно с работой гиалуронидазы (фермента, располагающегося на внешней мембране сперматозоида) позволяет сперматозоиду проложить путь через внеклеточный матрикс клеток кумулюса к яйцеклетке (Lin et al., 1994; Kimura et al., 2009).

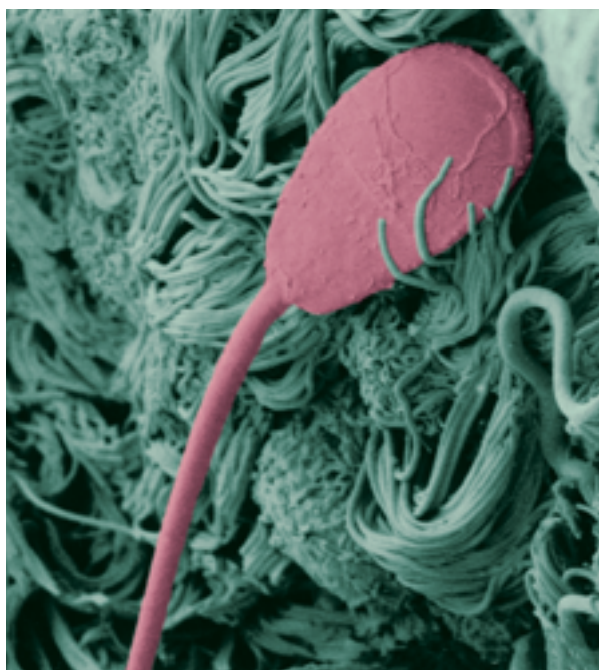
ТЕМПЕРАТУРНЫЙ И ХИМИЧЕСКИЙ ГРАДИЕНТЫ

Согласно старой шутке, мужчина выделяет так много сперматозоидов при эякуляции (семяизвержении) потому, что ни одна из мужских гамет не желает спросить направление. Так что же все-таки указывает сперматозоидам направление движения? Тепло — один из факторов. Между яйцеводом и его ампулярной частью существует перепад температуры в 2 °C, в ампуле яйцевода температура выше (Bahat et al., 2003, 2006). Капацитированные сперматозоиды млекопитающих способны ощутить разницу температур в пределах 0,014 °C на расстоянии около миллиметра. Для них характерно движение в направлении области с более высокой температурой (Bahat et al., 2012). Такая термочувствительность и способность перемещаться из более холодных к более теплым местам (**термотаксис**) характерна только для капацитированных сперматозоидов.

Капацитированные сперматозоиды способны также реагировать на пикомолярные концентрации **прогестерона** — гормона, секретируемого клетками кумулюса, окружающими яйцеклетку (Guidobaldi et al., 2008, 2017). Таким образом, когда сперматозоиды попадают в ампулу яйцевода, они способны почувствовать, где находится яйцеклетка. Однако неизвестно, все ли виды млекопитающих используют одинаковые химические и температурные сигналы.

АКРОСОМНАЯ РЕАКЦИЯ

После того как сперматозоиды попадают в ампулярную часть яйцевода, развивается акросомная реакция, однако это происходит только у капацитированных клеток. Данные, полученные на млекопитающих нескольких видов (Huang et al., 1981; Yanagimachi и Phillips, 1984; Jin et al., 2011), показывают, что



С разрешения: S. Suarez

Рис. 7.24. Микрофотография (дополнительно раскрашенная), полученная на электронном сканирующем микроскопе, показывает сперматозоид быка во время его прикрепления к мембранам эпителиальных клеток яйцевода до попадания в ампулярную часть

у «успешных» сперматозоидов (тех, которые в итоге оплодотворяют яйцеклетки) акросомная реакция происходит тогда, когда сперматозоиды достигают клеток кумулюса. Считается, что акросомная реакция может быть вызвана высокими концентрациями прогестерона вблизи яйцеклетки (Uñates et al., 2014; Abi Nahed et al., 2016; La Spina et al., 2016). Хотя точный механизм действия прогестерона при активации акросомной реакции не установлен, прогестерон может вызывать высвобождение протеинкиназы А (РКА) из мембраны сперматозоида, что в свою очередь приводит к открыванию специфических катионных каналов. Каналы CatSper способствуют переносу ионов Ca^{2+} внутрь сперматозоида, где они вызывают экзоцитоз акросомы (Stival et al., 2018).

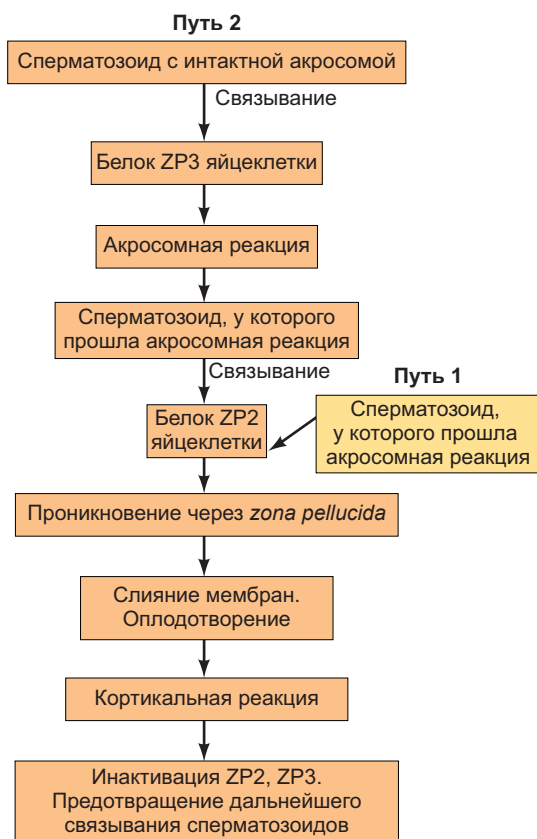


Рис. 7.25. Новейшая модель распознавания сперматозоидов оболочкой яйцеклетки (*zona pellucida*) мыши. Сперматозоид, у которого прошла акросомная реакция, связывается непосредственно с белком ZP2 (путь 1) и начинает формировать канал для передачи ядра ооциту. Сперматозоид с интактной акросомой связывается с ZP3 (путь 2), что приводит к развитию акросомной реакции, а затем связыванию с ZP2. Когда сперматозоид достигает ооцита и сливается с ним, из кортикальных гранул высвобождаются белки, которые разрушают части ZP2 и ZP3, делая их нефункциональными. Это препятствует дальнейшему проникновению сперматозоидов. (По данным: P. M. Wassarman and E. S. Litscher, 2018. *Curr Top Dev Biol* 130: 331–356.)

Распознавание *zona pellucida*

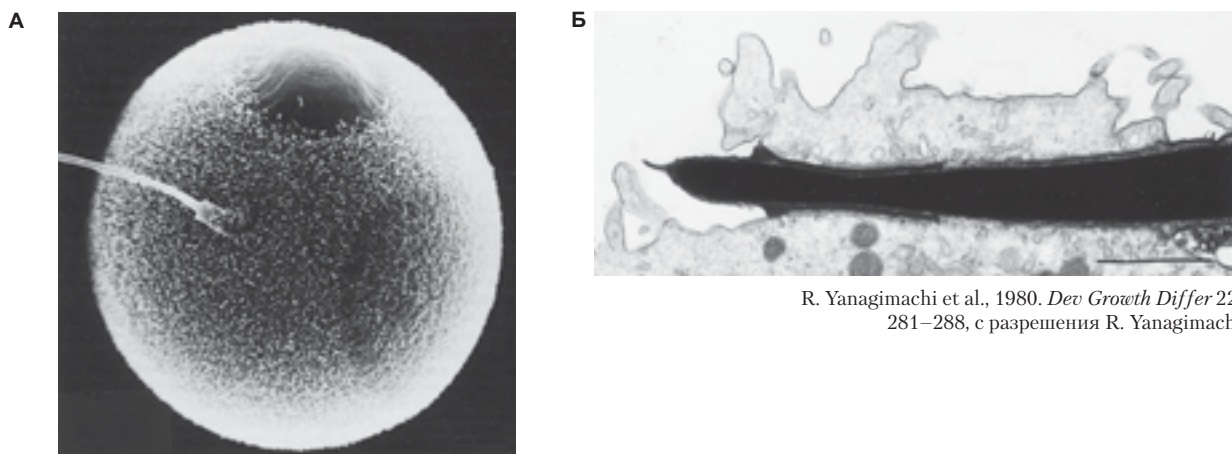
После прохождения через клетки кумулюса сперматозоид может вступить в контакт с *zona pellucida* — внеклеточным матриксом (оболочкой) яйцеклетки. *Zona pellucida* у млекопитающих выполняет те же функции, что и желточная оболочка у беспозвоночных. Однако блестящая оболочка млекопитающих отличается от желточной большей толщиной и плотностью. *Zona pellucida* у мыши построена из трех основных гликопротеинов ZP1, ZP2 и ZP3 наряду с дополнительными белками. Оболочка яйцеклетки человека построена из четырех основных гликопротеинов ZP1, ZP2, ZP3 и ZP4. Связывание сперматозоидов с *zona pellucida* относительно, но не абсолютно видоспецифично, и у различных видов животных могут быть реализованы различные механизмы для достижения этого связывания.

Яйцеклетка млекопитающих встречает гетерогенную популяцию сперматозоидов. У некоторых мужских клеток при достижении ими кумулюса акросомная реакция прошла, у других же нет. Однако у яйцеклетки могут быть механизмы для приема обоих типов капацитированных сперматозоидов (рис. 7.25; Wassarman and Litscher, 2018). В одном случае сперматозоид, у которого акросомная реакция прошла, связывается непосредственно с ZP2. В другом случае сперматозоид с интактной акросомой связывается с ZP3, что приводит к развитию акросомной реакции, после которой сперматозоид уже соединяется с ZP2 (Bleil and Wassarman 1980, 1983).

Слияние гамет и предотвращение полиспермии

СЛИЯНИЕ СПЕРМАТОЗОИДА И ЯЙЦЕКЛЕТКИ

Сперматозоид и яйцеклетка наконец встречаются. У млекопитающих в непосредственный контакт с яйцеклеткой вступает боковая поверхность головки, а не самый конец головки, как это происходит у морского ежа при проникновении сперматозоида в яйцеклетку перпендикулярно ее поверхности (рис. 7.26). В ходе акросомной реакции происходит не только выброс ферментов, но и обнажение внутренней мембраны акросомы. Соединение внутренней мембраны акросомы и мембраны сперматозоида называют **экваториальной областью**, именно в ней начинается слияние мембраны сперматозоида и яйцеклетки. По всей видимости, в слиянии принимают участие сразу несколько белков, среди них **Izumo**, расположенный на мембране акросомы, и **Juno**, локализованный на мембране яйцеклетки (рис. 7.27; Inoue et al., 2005; Bianchi et al., 2014). Эти белки связываются друг с другом и привлекают другие белки с целью образования комплекса, необходимо-



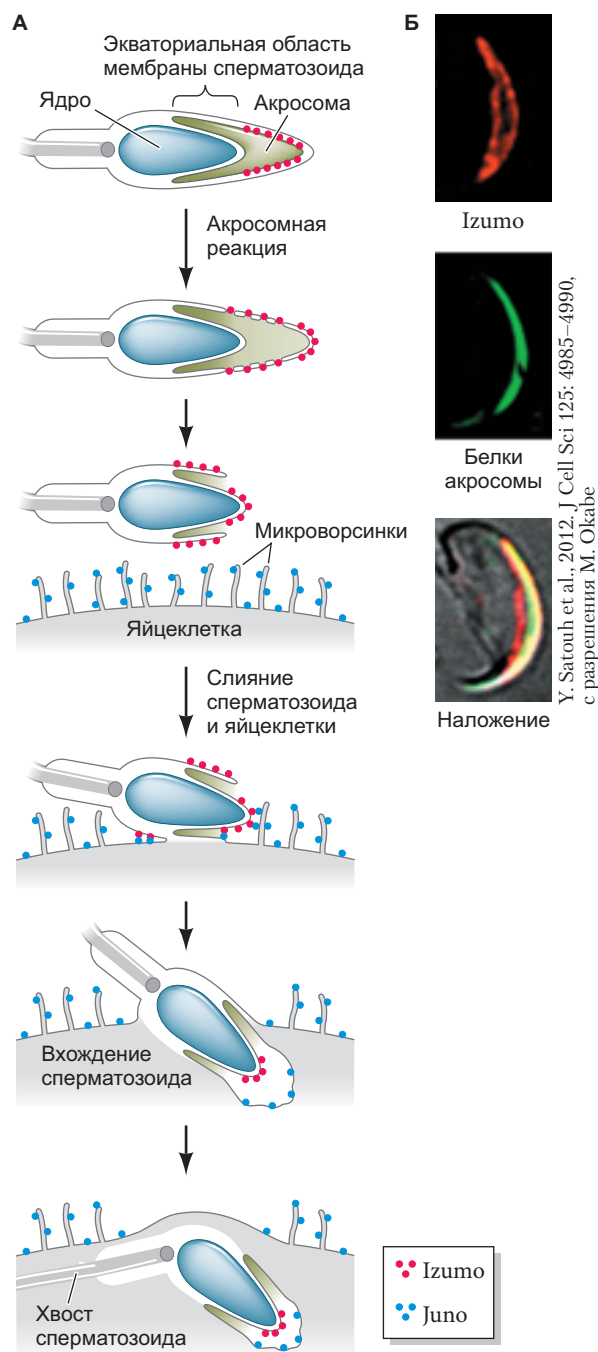
Р. Yanagimachi, 1981. In *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*, L. Mastroianni and J. D. Biggers (Eds.), Springer: Boston, MA, с разрешения

Рис. 7.26. Проникновение сперматозоида в яйцеклетку золотистого хомяка. **А.** Микрофотография сперматозоида, сливающегося с яйцеклеткой, полученная на сканирующем электронном микроскопе. «Голое» пятно (без микроворсинок) — место отделения редукционного тельца. Сперматозоиды не взаимодействуют с яйцеклеткой в этой области. **Б.** Микрофотография, полученная на просвечивающем электронном микроскопе, показывает сперматозоид, взаимодействующий своей боковой поверхностью с мембраной яйцеклетки

го для адгезии и слияния (Runge et al., 2006; Inoue et al., 2017). Любая мутация, происходящая в белке Juno или Izumo, приводит к невозможности оплодотворения. Как и при слиянии гамет морского ежа, сперматозоид млекопитающих связывается с той областью яйцеклетки, где идет полимеризация актина для удлинения микроворсинок в направлении сперматозоида (Yanagimachi and Noda, 1970).

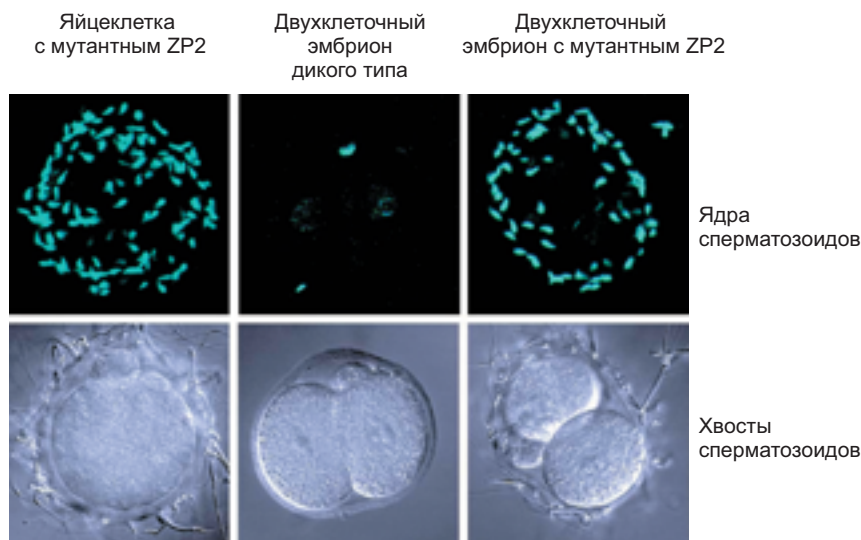
Сперматозоид не вбуравливается и не вкручивается в яйцеклетку, а происходит слияние и обобщение мембран, в результате чего две клетки становятся одной. Весь сперматозоид попадает внутрь яйцеклетки, включая жгутик и митохондрии. У млекопитающих, как и у морских ежей, большая часть митондрий, поступивших из сперматозоида, деградирует в цито-

Рис. 7.27. Белок Izumo и слияние мембран при оплодотворении у мышей. **А.** Схема слияния мембран сперматозоида и яйцеклетки. Во время акросомной реакции Izumo, располагавшийся на мембране акросомы, перемещается на мембрану сперматозоида, что позволяет данному белку взаимодействовать с комплексом белков Juno и других белков мембраны яйцеклетки, экспонированных на микроворсинках. Такое взаимодействие обеспечивает слияние мембран и проникновение сперматозоида в яйцеклетку. **Б.** Расположение Izumo на внутренней и наружной мембранах акросомы. Izumo окрашен в *красный цвет*, белки акросомы — в *зеленый*. (По данным: Y. Satouh et al., 2012, *J Cell Sci* 125: 4985–4990.)



Y. Satouh et al., 2012, *J Cell Sci* 125: 4985–4990, с разрешения M. Okabe

Рис. 7.28. Разрушение ZP2 необходимо для предотвращения полиспермии у млекопитающих. Фотографии яйцеклеток и эмбрионов получены при помощи флуоресцентной (для визуализации ядер сперматозоидов; *верхний ряд*) и светлопольной микроскопии (дифференциальный интерференционный контраст, чтобы визуализировать хвосты сперматозоидов; *нижний ряд*). Сперматозоиды связываются с яйцеклетками, содержащими мутантный ZP2, который не может быть разрушен. Яйцеклетка с ZP2 дикого типа (разрушаемым) очистилась от сперматозоидов на стадии двух бластомеров, тогда как яйцеклетка с мутантным ZP2 продолжает оставаться связанной со сперматозоидами, имеет место полиспермия



G. Gahlay et al., 2010. *Science* 329: 216–219, с разрешения J. Dean

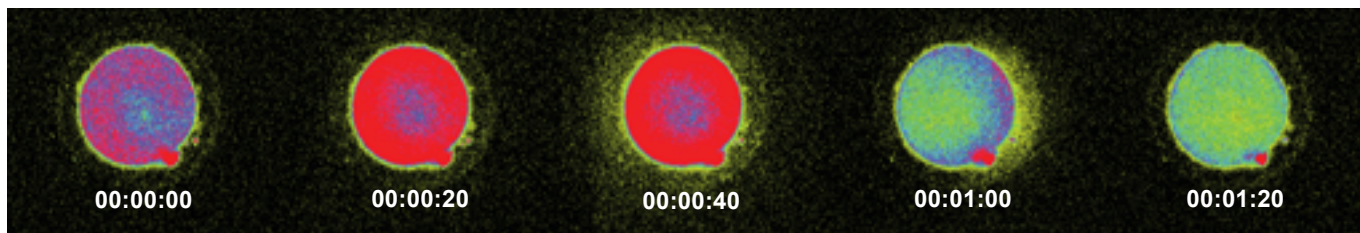
плазме яйцеклетки. Все митохондрии нового организма принято считать унаследованными от матери (Cummins et al., 1998; Shitara et al., 1998; Schwartz and Vissing, 2002), однако есть редкие исключения, описанные для людей (Luo et al., 2018). Благодаря такому наследованию мы имеем возможность проследить родственные связи от поколения к поколению, изучая митохондриальную ДНК.

БЛОКИ ПОЛИСПЕРМИИ

Проблема полиспермии актуальна и для млекопитающих, а не только для морских ежей. У млекопитающих еще не обнаружен быстрый блок полиспермии, связанный с изменением мембранного потенциала. Вероятно, этот механизм не является остро необходимым, так как ограниченное число сперматозоидов может достичь яйцеклетки (Gardner and Evans, 2006). Тем не менее *медленный* блок полиспермии, который у морских ежей связан с экзоцитозом кортикальных гранул, имеет место. Когда кортикальные гранулы

сливаются с мембраной яйцеклетки, выделяются ферменты, модифицирующие белки *zona pellucida* таким образом, что сперматозоиды больше не могут с ними связываться (Bleil and Wassarman, 1980). Одной из таких протеаз, содержащихся в кортикальных гранулах, является **овастацин** (ovastacin). Когда белок ZP2 расщепляется под действием овастацина, он теряет способность связывать сперматозоиды (**рис. 7.28**; Moller and Wassarman, 1989). Чаще всего полиспермия возникает при оплодотворении яйцеклеток мышей с мутантным ZP2, который не расщепляется овастацином (Gahlay et al., 2010; Burkart et al., 2012).

Второй медленный блок полиспермии развивается из-за так называемой цинковой вспышки, когда происходит высвобождение миллиардов ионов цинка, вызванное проникновением сперматозоида (**рис. 7.29**; Que et al., 2015, 2017; Duncan et al., 2016). Высвобожденные ионы цинка связываются с *zona pellucida*. Поскольку два фермента акросомы — акрозин и MMP2, а также ферменты, способствовавшие капацитации, ингибируются ионами цинка, накопле-



F. E. Duncan et al., 2016. *Sci Rep* 6: 24737/CC BY 4.0

Рис. 7.29. «Цинковая вспышка» при оплодотворении. После искусственной активации яйцеклетки человека путем стимуляции открывания Ca^{2+} -каналов можно наблюдать высвобождение ионов цинка по мере изменения интенсивности (сначала увеличения, а затем уменьшения). Внеклеточные скопления ионов цинка были обнаружены при помощи чувствительного флуоресцентного красителя. Использование цветов позволяет передать различия в интенсивности сигнала: *красный цвет* — самая высокая интенсивность, *зеленый цвет* — самая низкая интенсивность

Загадки развития

Одна из задач современной фармакологии — создание контрацептивов для мужчин. Анализируя стадии оплодотворения, предположите, какие из них, по вашему мнению, могут быть заблокированы фармакологически при применении таких разрабатываемых контрацептивов?

ние этих ионов в *zona pellucida* и в окружающем яйцеклетку кумулюсе может образовывать «цинковый щит», препятствующий входу дополнительных сперматозоидов (Kerns et al., 2018).

Третий медленный блок полиспермии имеет место на уровне мембраны яйцеклетки и задействует белок Juno (Bianchi and Wright, 2014). При сливании сперматозоида и яйцеклетки Juno, по-видимому, удаляется из мембраны ооцита. Кроме того, что происходит удаление сайта связывания сперматозоидов, растворимый белок Juno может связывать сперматозоиды в перивителлиновом пространстве между *zona pellucida* и мембраной ооцита, тем самым препятствуя связыванию сперматозоидов с Juno, оставшимся в мембране.

Активация яйцеклетки млекопитающих

Как и у других изученных животных, для активации яйцеклеток млекопитающих необходим кратковре-

менный рост концентрации Ca^{2+} в ее цитоплазме (Yeste et al., 2017; Kashir et al., 2018), и, так же как у морских ежей, ионы Ca^{2+} высвобождаются из внутриклеточного депо. Во время оплодотворения это высвобождение запускается посредством IP_3 , образующегося под действием фосфолипазы C (PLC) (Swann et al., 2006; Igarashi et al., 2007). Однако в отличие от морских ежей у млекопитающих PLC, ответственная за активацию яйцеклетки и формирование пронуклеуса, может поступать из сперматозоида, а не из яйцеклетки (Swann et al., 2006; Igarashi et al., 2007). Более того, эта фосфолипаза оказывается растворимым ферментом сперматозоида PLC ζ (PLC-зета), который попадает в яйцеклетку при слиянии гамет.

Слияние генетического материала

Как и у морского ежа, единственный сперматозоид млекопитающих, который в итоге проникает в яйцеклетку, вносит свой генетический материал в виде гаплоидного пронуклеуса. У млекопитающих процесс миграции пронуклеусов занимает около 12 ч, а у морских ежей — 1 ч.

Сперматозоид млекопитающих проникает в яйцеклетку, созревание которой остановилось на метафазе второго деления мейоза (рис. 7.30А, Б; см. также рис. 7.3). Так же как и у морского ежа, колебания концентрации Ca^{2+} , вызванные проникновением сперматозоида, инактивируют MAP-киназу и запу-

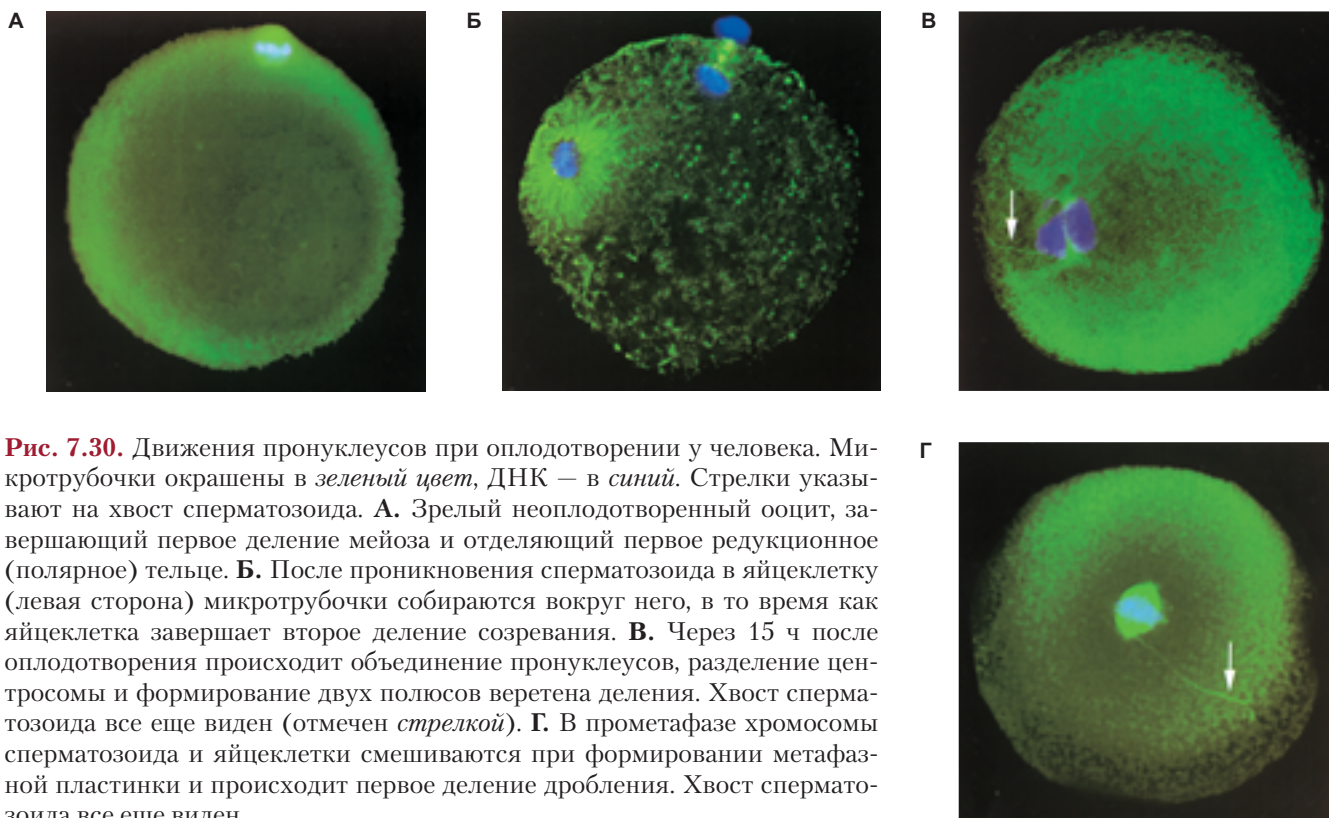


Рис. 7.30. Движения пронуклеусов при оплодотворении у человека. Микротрубочки окрашены в *зеленый цвет*, ДНК — в *синий*. Стрелки указывают на хвост сперматозоида. **А.** Зрелый неоплодотворенный ооцит, завершающий первое деление мейоза и отделяющий первое редукционное (полярное) тельце. **Б.** После проникновения сперматозоида в яйцеклетку (левая сторона) микротрубочки собираются вокруг него, в то время как яйцеклетка завершает второе деление созревания. **В.** Через 15 ч после оплодотворения происходит объединение пронуклеусов, разделение центросомы и формирование двух полюсов веретена деления. Хвост сперматозоида все еще виден (отмечен *стрелкой*). **Г.** В прометафазе хромосомы сперматозоида и яйцеклетки смешиваются при формировании метафазной пластинки и происходит первое деление дробления. Хвост сперматозоида все еще виден

скают синтез ДНК. Но в отличие от яйцеклетки морского ежа, которая завершила мейоз, хромосомы в яйцеклетке млекопитающих все еще находятся в середине второго деления мейоза — на метафазе. Колебания уровня Ca^{2+} активируют также киназу, регулирующую протеолиз циклина, что приводит к восстановлению клеточного цикла и белка секурина, который удерживает метафазные хромосомы вместе. Все эти процессы обеспечивают завершение мейоза и формирование женского пронуклеуса (Watanabe et al., 1991; Johnson et al., 1998).

Синтез ДНК происходит независимо в мужском и женском пронуклеусах, затем ДНК модифицируется в цитоплазме зиготы (Sutovsky and Schatten, 1997; Fraser and Lin, 2016). ДНК сперматозоида несет эпигенетические маркеры (в основном метильные группы), которые играли решающую роль при превращении клетки в сперматозоид. Точно так же ДНК ооцита была эпигенетически модифицирована, что требовалось для формирования яйцеклетки. Теперь же практически все метильные группы удалены, и геном возвращается в состояние «чистого листа», необходимое для поддержания тотипотентности. Модификация генетического материала сперматозоида тоже заключается в обратной замене протаминов на гистоны.

Два пронуклеуса движутся навстречу друг другу по микротрубочкам, собирающимся из тубулина яйцеклетки от centrosомы мужского пронуклеуса. При встрече происходит разрушение двух ядерных оболочек. Однако вместо того чтобы сформировать единое ядро зиготы (как это происходит у морского ежа), хроматин конденсируется, формируются хромосомы, которые располагаются на общем веретене деления, образованном центриолями сперматозоида (рис. 7.30В, Г). Таким образом, у млекопитающих истинно диплоидное ядро впервые может быть обнаружено не на стадии зиготы, а на стадии двух бластомеров. Ядро, сформировавшееся при оплодотворении, остается неактивным, пока не будут использованы материнские мРНК. У мышей это происходит на стадии двух клеток, у человека — после двух–четырех делений дробления (Fraser and Lin, 2016; Svoboda, 2017).

Оплодотворение у покрытосеменных растений

Опыление и не только: прогамная фаза

Оплодотворение у цветковых растений еще более необычное, чем у иглокожих и млекопитающих. Процесс начинается с опыления — прилипания пыльцевых зерен к женской части цветка (рыльцу пестика). Затем начинается **прогамная фаза** оплодотворения, охватывающая события от **опыления**

до оплодотворения яйцеклетки, находящейся в семязачатке. Эти процессы у растений имеют черты, схожие с процессами у животных. Например, у покрытосеменных растений: 1) пыльцевые зерна и пыльцевые трубки должны прийти в контакт и быть распознанными рыльцем и семязачатком соответственно; 2) необходима регуляция проникновения спермия в яйцеклетку; 3) должно произойти слияние генетического материала как спермия и яйцеклетки (что приведет к образованию нового растения), так и между спермием и центральной клеткой (что приведет к образованию эндосперма, который будет питать зародыш растения); 4) оплодотворенные клетки должны активироваться и начать развитие.

Пыльцевые зерна могут быть занесены на рыльце цветка различными переносчиками, включая насекомых, птиц, летучих мышей, а также ветром и водой. После того как пыльцевые зерна попадают на рыльце, они прилипают к нему, смачиваются и прорастают. Происходит раскрытие пыльцевого зерна и удлинение пыльцевой трубки, содержащей вегетативную клетку и два спермия. Вегетативная клетка — основа пыльцевой трубки (рис. 7.31). Время созревания и высвобождения пыльцы, активность опылителей и готовность рыльца принять пыльцу четко скоординированы (Bertin and Newman, 1993; Edlund et al., 2004; McInnes et al., 2006). В некотором смысле такая координация напоминает регуляцию у млекопитающих. Если нанести пыльцу на незрелое рыльце *Arabidopsis thaliana*, то незрелые семязачатки не могут регулировать вхождение спермиев, что приводит к нарушению прорастания пыльцевой трубки и полиспермии (Nasrallah et al., 1994).

Попадание жизнеспособной пыльцы на восприимчивое рыльце не будет гарантией наступления оплодотворения. Успешность оплодотворения зависит от совместимости растения, вырабатывающего пыльцу, и растения, несущего воспринимающие органы (рыльце). Среди покрытосеменных несовместимыми могут быть растения разных видов, разные особи одного и того же вида, а также пыльца и рыльце одного растения. Распознавание координируется работой нескольких генов, в частности, аллелями S-локуса, регулирующими взаимодействие пыльцы и рыльца (Gauze and McCormick, 1999; Rea and Nasrallah, 2008; Tantikanjana et al., 2009).

Прорастание пыльцы и удлинение пыльцевой трубки

Если пыльца и рыльце оказываются совместимыми, пыльцевое зерно увлажняется, что приводит к прорастанию пыльцевой трубки. Каким образом пыльцевая трубка покидает пыльцевое зерно? У большинства пыльцевых зерен в стенке присут-

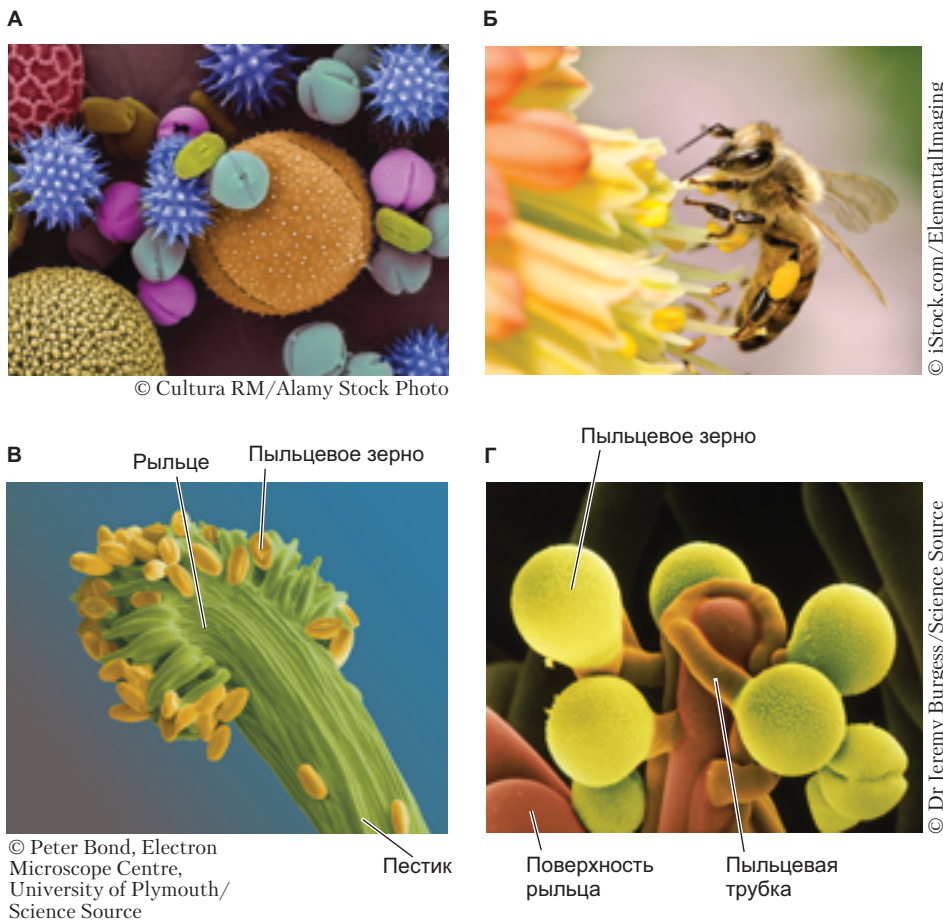


Рис. 7.31. Опыление. **А.** Пыльцевые зерна разных видов растений различаются по размеру, форме, цвету и строению поверхности. **Б.** Пчелы и другие насекомые (а также некоторые птицы) — эффективные опылители, переносящие пыльцу с одного цветка на другой. Обратите внимание на желтую пыльцу на конечности пчелы. **В.** Пыльца утесника европейского (*Ulex europaeus*) несет клетки, которые преодолевают сантиметры ткани, чтобы достичь семязачатка у основания пестика. **Г.** Пыльцевые зерна (зеленый цвет) снотворного мака прорастают пыльцевыми трубками, конкурируя за доступ к семязачатку

ствуется, по крайней мере, одно отверстие, называемое **апертурой** (порой), через которое прорастает пыльцевая трубка. Если в стенке пыльцевого зерна присутствует больше одной апертуры, то пыльцевая трубка использует отверстие, ближайшее к точке контакта с поверхностью рыльца. Некоторые пыльцевые зерна лишены апертур, у других они есть, но не используются при прорастании пыльцевой трубки, как, например, у модельного организма *Arabidopsis thaliana*. У этого растения прорастание пыльцевых трубок происходит в несколько этапов: 1) набухания внутренней области, богатой пектином, приводящего к деформации вышележащей стенки пыльцы; 2) локального окисления, которое приводит к ослаблению стенки пыльцы в месте контакта с рыльцем (Edlund et al., 2016, 2017). Это позволяет пыльце сформировать отверстие в любом участке стенки.

После выхода пыльцевой трубки за пределы пыльцевого зерна она начинает ферментативно переваривать клеточные стенки рыльца (Кнох and Heslop-Harrison, 1970) и вращать в рыльце пестика, продвигаясь по направлению к отверстию в семязачатке, которое называют **микропиле** (рис. 7.32). Вегетативное ядро трубки и два спермия удерживаются на конце роста благодаря каллозе — сложному углеводу. Это явление может быть исключением из правила о неподвижности растительных

клеток, так как спермии, по-видимому, способны двигаться вперед благодаря молекулам адгезии (Lord et al., 1996). Чтобы продвинуться на расстояние многих сантиметров от рыльца до семязачатка, спермии и вегетативное ядро совместно располагаются на конце растущей пыльцевой трубки как единый «мужской зародышевый блок» (Sprunck et al., 2014).

Ориентирование пыльцевой трубки

Пыльцевая трубка совершает длинный путь, пробивается через рыльце, прорастает внутри тканей пестика и достигает микропиле семязачатка (Zheng et al., 2018). Успешность миграции пыльцевой трубки и двух спермиев через плодolistик зависит от перекрестных взаимодействий генома пыльцевого зерна и плодolistика. Во взаимодействии вовлечены секретируемые молекулы, сигнальные пути и ионы Ca^{2+} (Palanivelu and Tsukamoto, 2012; Dresselhaus and Franklin-Tong, 2013; Li et al., 2018). Клетка пыльцевой трубки растет с высокой скоростью (около 1 см/ч) и достигает отверстия микропиле.

Две специализированные клетки в составе зародышевого мешка, называемые синергидами, привлекают пыльцевую трубку, направляя ее рост в нужном

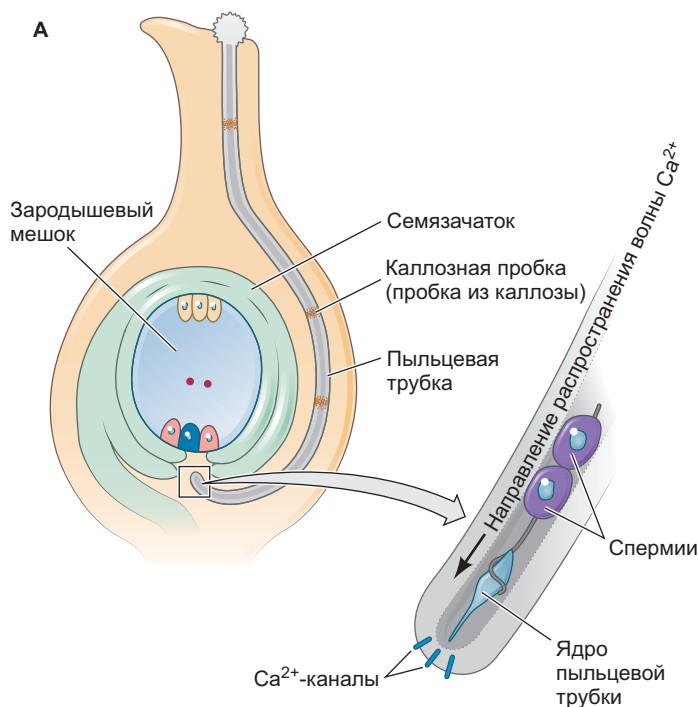
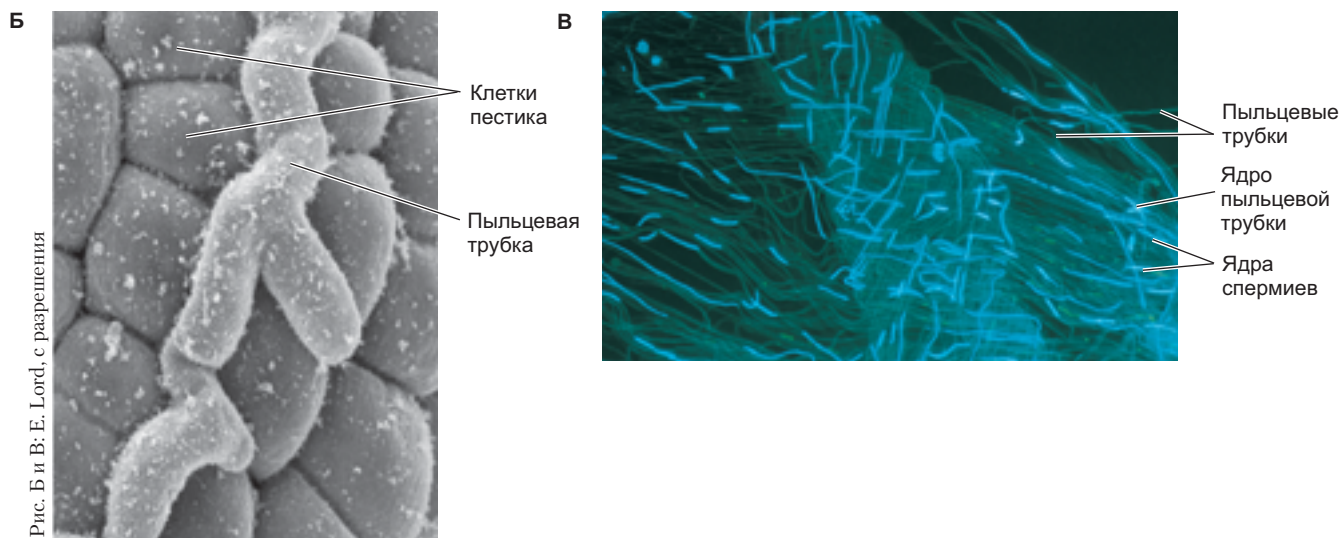


Рис. 7.32. Прорастание пыльцевой трубки. **А.** Зародышевый мешок образуется в результате трех митотических делений гаплоидной мегаспоры, он состоит из семи клеток и восьми гаплоидных ядер. Два полярных ядра в центральной клетке будут сливаться с ядром второго спермия и формировать эндосперм, необходимый для питания яйцеклетки. Другие шесть клеток, включая яйцеклетку, содержат по одному гаплоидному ядру. После прорастания пыльцевого зерна пыльцевая трубка подрастает к микропиле. Три клетки на конце трубки связаны друг с другом. Волны Ca^{2+} играют ключевую роль в росте пыльцевой трубки. **Б.** Микрофотография пыльцевой трубки *A. thaliana*, продвигающейся к семязачатку для осуществления оплодотворения (получена на сканирующем электронном микроскопе). **В.** Пыльцевые трубки лилии, выращенные *in vivo* и выделенные из семязачатка. Каждая зеленая нить — отдельная пыльцевая трубка, содержащая два ядра спермиев (ярко-синие пятнышки) и ядро трубки (светло-синее). Особенно важно, что огромное количество пыльцевых трубок конкурирует за оплодотворение одной яйцеклетки (Рис. А по данным: V. E. Franklin-Tong, 2002. *Curr Opin Plant Biol* 5: 14–18.)



направлении. У *Torenia fournieri* зародышевый мешок выступает из микропиле, его можно культивировать в условиях *in vitro*, в которых он также сохраняет способность привлекать пыльцевые трубки. Higashiyama с соавторами (2001) использовали лазер для разрушения отдельных клеток в зародышевом мешке, а затем проверили, сохранилась ли способность к привлечению пыльцевых трубок. После разрушения обеих синергид направленный рост пыльцевых трубок к зародышевому мешку нарушался, но если хотя бы одна синергида сохранялась, то пыльцевые трубки демонстрировали направленный рост. По-видимому, синергиды выделяют специфичные полипептиды, которые служат для привлечения пыльцевой трубки на финальных этапах ее прорастания (Okuda and Higashiyama, 2010).

Двойное оплодотворение

Растущая пыльцевая трубка входит внутрь зародышевого мешка через микропиле и проходит сквозь одну из синергид. Затем спермии высвобождаются, и происходит **двойное оплодотворение** (Southworth, 1996; Dresselhaus et al., 2016). Один спермий соединяется с яйцеклеткой с образованием зиготы, из которой будет развиваться новое растение. Второй спермий сливается с двуядерной центральной клеткой, давая начало **эндосперму** — ткани, питающей развивающийся зародыш. Второе событие не является «истинным» оплодотворением в контексте слияния гамет, так как приводит не к образованию зиготы, а только к образованию поддерживающей и питающей ткани. Другие вспомогательные клет-

ки зародышевого мешка после оплодотворения дегенерируют, а клетки, покрывающие семязачаток, затвердевают и формируют семенную кожуру, что можно видеть на поверхности черных семян арбуза, но не белых и мягких семян «бессемянных» арбузов. Двойное оплодотворение, впервые описанное 100 лет назад, характерно для покрытосеменных растений. Фридман (Friedman, 1998) предположил, что эндосперм может происходить из второй зиготы, «принесенной в жертву» как источник питательных веществ у голосеменных с двойным оплодотворением.

Как у морских ежей и млекопитающих, для двойного оплодотворения покрытосеменных растений характерно наличие блока полиспермии. Как только синергида привлекли пыльцевую трубку в микропиле, одна из них встречается с пыльцевой трубкой, что приводит к катастрофическим событиям, связанным со смертью обоих партнеров (Denninger et al., 2014). Во-первых, синергида дегенерирует. Это препятствует проникновению других пыльцевых трубок через микропиле (Dresselhaus and Marton, 2009; Higashiyama и Takeuchi, 2015; Maruyama et al., 2015). Во-вторых, пыльцевая трубка разрывается, и происходит высвобождение двух спермиев.

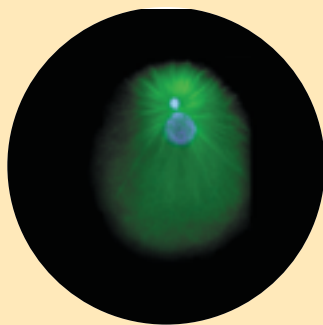
Так же как и у животных, оплодотворение у покрытосеменных растений приводит к взаимной активации гамет. Когда спермии высвобождаются, яйцеклетка подвергается воздействию потока Ca^{2+} . После этого химические вещества, выделяемые яйцеклеткой, воздействуют на спермий, делая его способным сливаться с ней. В целом эти результаты показывают, что сначала во время или сразу вскоре после высвобождения спермия происходит активация яйцеклетки, что, в свою очередь, приводит к активации спермиев, позволяя им быстро приступить

к слиянию (Dresselhaus et al., 2016). Крайне мало изучены химические процессы, лежащие в основе как оплодотворения спермием яйцеклетки, так и слияния другого спермия с центральной клеткой, но выявление у растений консервативных белков, участвующих в слиянии гамет, дает некоторые интересные подсказки (Mori et al., 2015; Clark, 2018).

Оплодотворение не является необходимым условием для развития зародыша у покрытосеменных растений (Mogie, 1992). Зародыш может быть сформирован внутри зародышевого мешка, возникшего из клеток, не делящихся мейозом. Это явление, встречающееся, например, у одуванчиков, носит название апомиксис (от греч. «без смешивания») и приводит к образованию жизнеспособных семян. Действительно, жизнеспособные растения можно получить из черенков, в которых скопление клеток, называемое каллусом, формирует меристему, дающую начало новому целому растению (Sugimoto et al., 2011; Ikeuchi et al., 2016).

Послесловие

Оплодотворение — сложный процесс, включающий множество четко организованных и скоординированных событий, таких как контакт и слияние гамет, объединение ядер и активация развития. При оплодотворении две клетки, каждая из которых находится на грани гибели, объединяются, для того чтобы создать новый организм, состоящий из множества типов клеток. Это только самое начало в ряду точных взаимодействий, характерных для развития животных и растений.



С обложки журнала
Developmental Biology. J. Holy
and G. Schatten, 1991. *Dev Biol*
147: 343–353

О фотографии в начале главы

Когда Оскар Гертвиг (Oscar Hertwig, 1877) изучал оплодотворение у морских ежей, он с восторгом наблюдал то, что назвал потом «солнцем в яйцеклетке». То, что он видел, оказалось микротрубочками, растущими от centrosомы сперматозоида. Микротрубочки находят женский пронуклеус и приходят с ним в контакт, после чего начинается движение пронуклеусов вдоль микротрубочек навстречу друг другу. На представленной микрофотографии ДНК в составе пронуклеусов окрашена в синий цвет, женский пронуклеус намного крупнее мужского. Микротрубочки окрашены в зеленый цвет.



Коротко

Оплодотворение: начало нового организма

1. Оплодотворение выполняет две основные функции: половую (объединение генетического материала двух родительских организмов) и репродуктивную (создание нового организма).
2. Во время оплодотворения происходят следующие события: 1) контакт и узнавание сперматозоида и яйцеклетки; 2) регуляция проникновения сперматозоида в яйцеклетку; 3) объединение генетического материала двух гамет; 4) активация метаболизма яйцеклетки и развития нового организма.
3. У животных в головке сперматозоида содержится гаплоидное ядро и акросома. Акросома — производное аппарата Гольджи, заполнена ферментами, необходимыми для растворения оболочек яйцеклетки. В шейке сперматозоида (средняя часть) расположены митохондрии и центриоль, от которой расходятся микротрубочки, формирующие жгутик сперматозоида. Поставщиком энергии для биения жгутика служат митохондрии, синтезирующие АТФ, и динеиновая АТФаза.
4. Женские гаметы могут находиться в состоянии зрелой яйцеклетки, завершившей мейоз и обладающей гаплоидным ядром, как у морского ежа, или в состоянии ооцита на более ранней стадии развития, как у млекопитающих. В яйцеклетке или ооците запасен большой объем цитоплазмы и располагаются рибосомы и белки, необходимые для питания будущего организма. Часть мРНК и белков, которые будут использованы в качестве морфогенетических факторов, тоже запасены в яйцеклетке. Во многих яйцеклетках содержатся также вещества, обеспечивающие выживание гаметы и впоследствии эмбриона в конкретных условиях среды.
5. Снаружи от мембраны яйцеклетки расположен слой внеклеточного матрикса, участвующего в узнавании сперматозоида. У большинства животных его называют желточной оболочкой. У млекопитающих оболочка представляет собой более толстый слой и носит название *zona pellucida*. Под мембраной яйцеклетки располагаются кортикальные гранулы.
6. Ни яйцеклетка, ни сперматозоид не выполняют только «активную» или «пассивную» роль при оплодотворении; сперматозоид активируется под воздействием яйцеклетки, а яйцеклетку активирует сперматозоид. Для обоих процессов активации необходимо участие ионов Ca^{2+} и слияние мембран.
7. У многих растений и животных яйцеклетки или окружающие их клетки выделяют молекулы, которые привлекают и активируют сперматозоиды. Ими могут быть видоспецифичные молекулы, как у морских ежей, обеспечивающие привлечение к яйцеклетке сперматозоидов своего вида.
8. Во время акросомной реакции происходит экзоцитоз акросомы с высвобождением протеолитических ферментов, которые разрушают защитную оболочку яйцеклетки, позволяя тем самым сперматозоиду достичь яйцеклетки и слиться с ее мембраной. У морских ежей акросомную реакцию запускают соединения, содержащиеся в студенистой оболочке яйцеклетки. Глобулярный актин полимеризуется, и образуется акросомный вырост. У морского ежа биндин на акросомном выросте распознается белковым комплексом на поверхности яйцеклетки.
9. Слияние сперматозоида и яйцеклетки обеспечивают белковые молекулы, гидрофобные группы которых облегчают объединение мембран.
10. Когда два или более сперматозоида проникают в одну яйцеклетку, возникает полиспермия. Обычно она приводит к гибели эмбриона, так как в бластомерах содержится различное число или различные типы хромосом.
11. У многих видов животных имеет место два блока полиспермии. Быстрый блок развивается мгновенно, но быстро проходит, так как связан с увеличением потенциала покоя на мембране яйцеклетки. В результате такого изменения сперматозоиды больше не могут сливаться с мембраной. У морских ежей в этом процессе принимают участие ионы Na^+ . Медленный блок, или кортикальная реакция, опосредован ионами Ca^{2+} , формирует физическую преграду и является постоянным. Волна ионов Ca^{2+} распространяется от места проникновения сперматозоида и вызывает экзоцитоз кортикальных гранул. У морских ежей высвобождение содержимого кортикальных гранул приводит к формированию и затвердеванию оболочки оплодотворения.
12. Слияние сперматозоида и яйцеклетки приводит к восстановлению клеточного цикла яйцеклетки и активирует последующие митотические деления, а также способствует возобновлению синтеза ДНК и белков.
13. У всех изученных видов животных наличие свободных ионов Ca^{2+} в совокупности с подщелачиванием цитоплазмы приводит к активации метаболизма яйцеклетки, синтеза белка и ДНК. Инозитолтрифосфат (IP_3) отвечает за высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточного депо — эндоплазматического ретикулума. Диацилглицерол (DAG) инициирует повышение pH в яйцеклетке.
14. IP_3 образуется под действием фосфолипазы C. У разных видов животных могут быть реализованы различные механизмы активации фосфолипазы.
15. Мужской и женский пронуклеусы мигрируют навстречу друг другу и сливаются, образуя диплоидное ядро зиготы.

16. У млекопитающих оплодотворение происходит внутри половых путей самки. Клетки и ткани половых путей принимают активное участие в регуляции транспорта и созревания как мужских, так и женских гамет.
17. Перемещение сперматозоидов из влагалища к яйцеклетке регулируется мышечной активностью матки, связыванием сперматозоидов в месте сужения яйцевода и направленными сигналами, исходящими от яйцеклетки или клеток кумулюса, окружающих ее.
18. Сперматозоиды млекопитающих должны пройти капацитацию в половых путях самки, до того как станут способными оплодотворить яйцеклетку. Капацитированный сперматозоид млекопитающих может проникать через клетки кумулюса и связываться с *zona pellucida*.
19. Согласно недавно предложенной модели связывания с яйцеклеткой сперматозоидов млекопитающих, имеющих интактные акросомы, сначала происходит взаимодействие с ZP3 на оболочке, что приводит к развитию акросомной реакции. Сперматозоид, у которого акросомная реакция прошла после прохождения через клетки кумулюса, связываются с ZP2.
20. У млекопитающих блоки полиспермии связаны с модификацией белков оболочки яйцеклетки содержащим кортикальных гранул, приводящей к тому, что сперматозоиды больше не могут связываться с *zona pellucida*.
21. Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} во время оплодотворения у млекопитающих приводит к деградации циклина и инактивации MAP-киназы, что позволяет завершить второе деление мейоза и сформировать зрелый женский пронуклеус.
22. У млекопитающих репликация ДНК происходит во время движения пронуклеусов по направлению друг к другу. Мембраны пронуклеусов распадаются по мере их сближения, и хромосомы формируют общую метафазную пластинку.
23. У покрытосеменных растений оплодотворение начинается в прогамной фазе, когда пыльца прикрепляется к рыльцу. Пыльца прорастает с образованием длинной трубки. Два спермия следуют за ядром пыльцевой трубки, а взаимодействие ядра трубки с пестиком позволяет переместить пыльцевую трубку к микропиле семязачатка.
24. Пыльцевую трубку привлекают к микропиле синергиды. После того как пыльцевая трубка прорастает, она раскрывается, для того чтобы высвободить спермии, один из которых будет сливаться с гаплоидной яйцеклеткой с образованием диплоидной зиготы, а другой — с двудерной центральной клеткой.

Улитки, цветы и нематоды:

разные механизмы для схожих паттернов спецификации

Как выглядит спирализация?



При оплодотворении организм получает новый геном, а его цитоплазма перераспределяется. С этого момента образовавшаяся зигота приступает к формированию многоклеточного организма. В период **дробления** в результате быстрых клеточных делений из зиготы возникает множество клеток. У животных эти клетки после ряда драматических перемещений во время **гастрюляции** попадают в определенные части эмбриона и приобретают новых соседей. Мы описали типы дробления и гастрюляции в гл. 1 (см. рис. 1.9 и табл. 1.1). Клетки растений не могут мигрировать из-за жесткой клеточной стенки, и поэтому организация их частей основана на ранней разметке клеточных делений и роста.

Основные оси тела большинства животных и растений специфицируются на ранних этапах развития в результате процесса, удачно названного **детерминацией осей**. О главной оси тела растения — апикально-базальной оси — мы говорили в гл. 2 и 4 (см. рис. 2.10 и 4.29). Но для структуры растений характерен также радиальный или спиральный паттерн, как в случае листьев, окружающих стебель, и частей цветка, выходящих из его центра. Эти паттерны контролирует самоорганизующаяся система межклеточных взаимодействий. У ранних эмбрионов большинства животных специфицируются три оси: передне-задняя (от головы к хвосту), дорсально-вентральная (от спины к брюху) и лево-правая (см. рис. 1.10). У разных видов оси формируются в разное время и с помощью различных механизмов. У одних (например, у *Drosophila*) детерминация осей начинается уже при образовании ооцитов. У других она происходит во время дробления или даже продолжается в течение гастрюляции (например, у *Xenopus*).

В главах этого раздела будет рассмотрена детерминация осей у нескольких групп животных, для которых мы опишем раннее развитие от дробления

до гастрюляции. В первую очередь у видов, ставших важными модельными организмами (улиток, нематод, плодовых мушек, морских ежей, лягушек, рыбок *Danio*, кур и мышей; узнать о преимуществах модельных организмов можно в гл. 1, рис. 1.4). Мы сравним также развитие спиральных паттернов у улиток и растений, чтобы лучше понять, как схожие результаты могут быть достигнуты различными механизмами.

Напоминание об эволюционном контексте, в котором возникли стратегии регуляции раннего развития

Быть **многоклеточным эукариотическим организмом** (т. е. растением, грибом или животным) означает состоять из множества образованных митозом клеток, объединенных в функциональное целое. И растения, и животные произошли от последнего общего предка эукариот (см. рис. 1.25), что позволяет предполагать наличие молекулярных и клеточных гомологий между ними. Важно понимать, что любые аналогичные процессы или конвергентные механизмы эволюции между растениями и животными помогли бы выявить действительно основополагающие принципы развития.

Быть **Metazoa** означает быть животным, а быть животным — означает претерпеть гастрюляцию во время развития. Все животные гастрюлируют, другие организмы нет. Отдельные группы животных имеют разные паттерны развития. Когда мы говорим, что существует 35 типов Metazoa, мы утверждаем, что существует 35 сохранившихся до наших дней паттернов развития животных (Davidson and Erwin, 2009; Levin et al., 2016). Эти типы организации постепенно возникали на ветвях древа жизни, описанного в гл. 1 (см. рис. 1.21). При изучении механизмов, регулирующих раннее эмбриональное развитие, следует помнить, что есть четыре основные ветви Metazoa: группа базальных типов, лофотрохозои и экдизозои (первичноротые) и вторичноротые (рис. 8.1). Сходства и различия в раннем эмбриональном развитии применяют для распределения животных по типам. Особое внимание уделяют четырем эмбриональным критериям: 1) имеет животное два или три зародышевых листка; 2) когда и где образуются его рот и анус; 3) тип раннего дробления; 4) наличие зародышевой структуры, известной как хорда.

Двухслойные животные: стрекающие и гребневики

Животных с двумя зародышевыми листками — эктодермой и энтодермой, но без выраженной мезодермы, таких как стрекающие (медузы и гидры) и гребневи-

ки, называют **двухслойными**. Долгое время считалось, что, в отличие от двусторонне симметричных трехслойных животных, имеющих три зародышевых листка, двухслойные стрекающие и гребневики имеют радиальную симметрию и не имеют мезодерму. Однако такие четкие различия в настоящее время ставятся под сомнение, по крайней мере, в отношении Cnidaria. Хотя у таких стрекающих, как гидра, нет настоящей мезодермы, у других, по видимому, есть некое ее подобие, а у третьих проявляется двусторонняя симметрия на определенных этапах их жизненного цикла (Martindale et al., 2004; Martindale, 2005; Matus et al., 2006; Steinmetz et al., 2017). Тем не менее мезодерма у стрекающих могла развиваться независимо от мезодермы первично- и вторичноротых.

Трехслойные животные: первично- и вторичноротые

Подавляющее большинство видов Metazoa имеют три зародышевых листка — эктодерму, энтодерму и мезодерму и, таким образом, **трехслойны**. Эволюция мезодермы позволила увеличить подвижность и размеры тела, поскольку из нее развиваются мускулатура и система кровообращения. Трехслойных животных называют также **билатеральными**, потому что они двусторонне симметричны, т. е. имеют правую и левую стороны. Билатеральных подразделяют на **первичноротых** и **вторичноротых** (рис. 8.1).

ПЕРВИЧНОРОТЫЕ

Первичноротые, или Protostomia (от греч. πρωτο — первый и στόμα — рот), включают моллюсков, членистоногих и червей и называются так, потому что рот формируется первым из (или около) отверстия кишки, которое образуется во время гастрюляции. Анус образуется позже в другом месте. **Целом**, или полость тела, формируется **шизоцельным** путем, т. е. в результате появления пустот в ранее цельном тяж мезодермальных клеток.

Различают две основные ветви первичноротых. **Экдизозои** (от греч. ἐκδύω — снимать или сбрасывать) — это те животные, которые сбрасывают свои внешние скелеты, т. е. линяют. Самая показательная группа экдизозой — Arthropoda (членистоногие), хорошо изученный тип, включающий насекомых, паукообразных, клещей, ракообразных и многоножек. Молекулярный анализ позволил поместить в эту кладу и другую линяющую группу — нематод. Представителей второй крупной группы первичноротых под названием **лофотрохозои** характеризуют общий (спиральный) тип дробления и общая личинная форма (трохофора). Лофотрохозои включают 14 из 35 типов Metazoa, в том числе плоских, кольча-

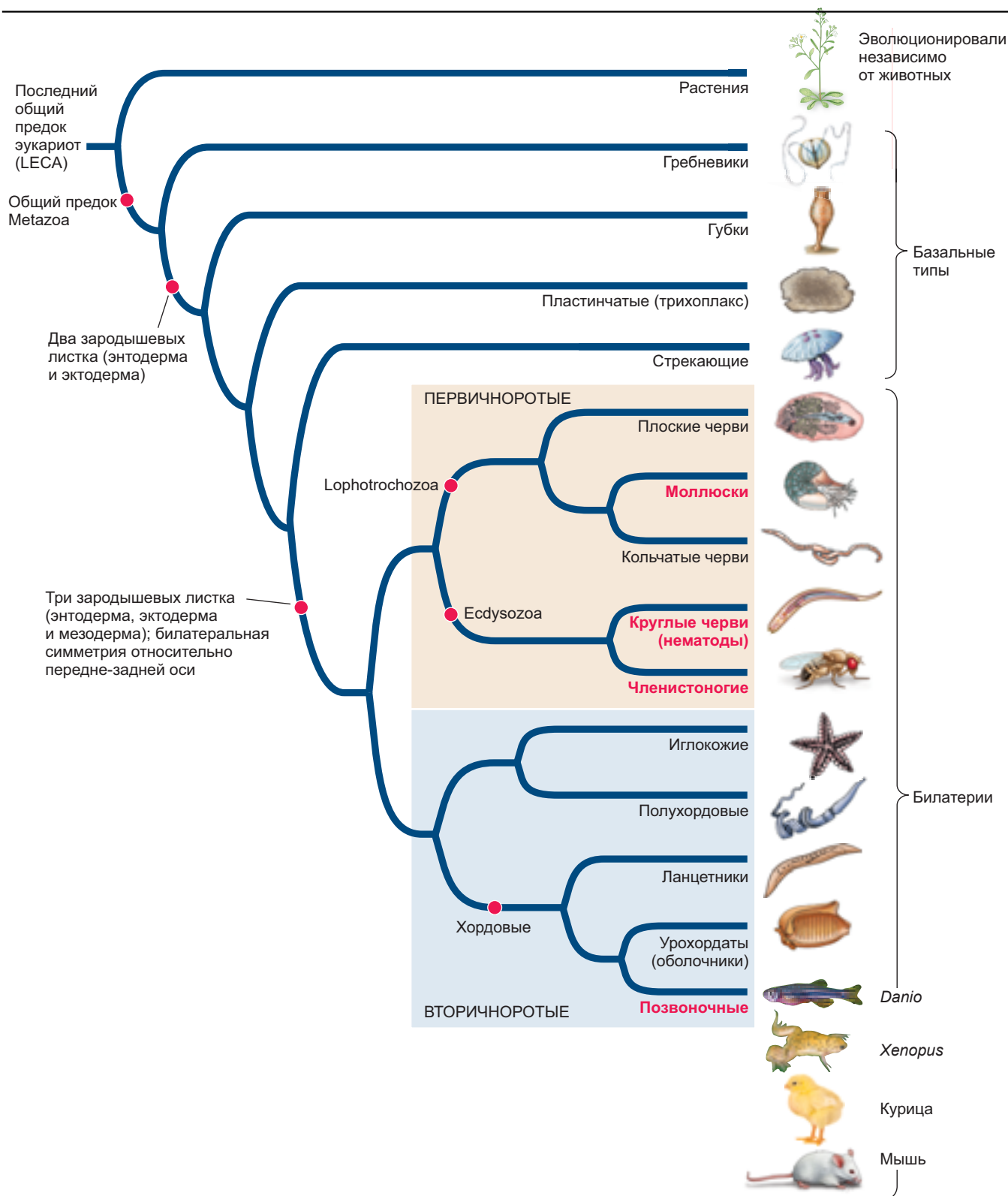


Рис. 8.1. Схематическое древо жизни: внимание сфокусировано прежде всего на филогенетических отношениях животных. Гребневики считаются сестринской кладой по отношению к остальным животным (т. е. группой, которая раньше всех отделилась от остальных). Четыре основные ветви современных животных: базальные типы, первичноротые лопотрохоzoи, первичноротые экдизозои и вторичноротые. Изображения трех первичноротых — брюхоногого моллюска (улитки), нематоды *Caenorhabditis elegans* и плодовой мушки *Drosophila* — организмов, развитие которых подробно описано здесь и в гл. 9. Вторичноротые будут рассмотрены в гл. 10, 11 и 12. (По данным: S. J. Boulart et al., 2006. *Nature* 444: 85–88; F. Delsuc et al., 2005. *Nature* 439: 965–968; B. Schierwater et al., 2009. *PLOS Biol* 7: e1000020; A. Hejnol., 2012. *Nature* 487: 181–182; J. F. Ryan et al., 2013., *Science* 342: 1242592.)

тых червей и моллюсков. Программа спирального дробления настолько характерна для этой группы, что термин *спираль* стал еще одним способом ее описания (Henry, 2014).

ВТОРИЧНОРОТЫЕ

Основными ветвями вторичноротых являются хордовые (включая позвоночных) и иглокожие. Хотя может показаться странным помещать людей, рыб и лягушек в одну группу с морскими звездами и морскими ежами, некоторые эмбриологические особенности подчеркивают их родство. Во-первых, у большинства вторичноротых, или Deuterostomia (от греч. δεῦτερος — второй и στόμα — рот) ротовое отверстие формируется после анального. Кроме того, в отличие от шизоцельного формирования целома, характерного для первичноротых, большинство вторичноротых образуют полость тела **энтероцельно**, т. е. вытягивая мезодермальные карманы из кишечника. (Существует много исключений из этого обобщения; Martín-Durán et al., 2012.)

Вспомните из гл. 1, что ланцетников (Cephalochordata; *Amphioxus*) и оболочников (Urochordata; асцидии) относят к беспозвоночным, так как они не имеют позвоночника. Тем не менее у *личинки* этих организмов есть хорда и глоточные дуги¹, что подтверждает их принадлежность к хордовым (см. рис. 1.20A). **Хорда**, вызывающая образование спинного мозга позвоночных, дала название всему типу.

Что дальше?

В этой главе мы сконцентрируемся на двух группах первичноротых беспозвоночных: брюхоногих моллюсках (представлены улитками) и нематодах (представлены *Caenorhabditis elegans*). Несмотря на различия в раннем развитии, обе группы приобрели быстрое развитие до личиночной стадии (Davidson, 2001). Особое внимание будет также уделено событиям, приводящим к развитию спиральных паттернов у улиток. Эти паттерны мы будем противопоставлять развитию их аналогов у независимо эволюционировавшего покрытосеменного растения *Arabidopsis thaliana*.

Раннее развитие у улиток

Как модельные организмы улитки имеют долгую историю в биологии развития. Их много на берегах всех континентов, они хорошо растут в лаборато-

рии и демонстрируют вариации развития, которые хорошо соотносятся с их экологическими потребностями. Некоторые улитки имеют крупные яйца, быстро развиваются и детерминируют типы клеток очень рано в развитии. Хотя каждый организм использует как автономные, так и обусловленные способы спецификации клеток (см. гл. 2), улитки являются одним из лучших примеров автономного развития, в котором потеря раннего бластомера приводит к потере всей структуры. В самом деле, у эмбрионов улиток клетки, ответственные за развитие определенных органов, могут быть в значительной степени локализованы. Результаты экспериментальной эмбриологии сегодня могут быть расширены (и объяснены) с помощью молекулярного анализа, что приводит к захватывающему синтезу развития и эволюции (см. Conklin, 1897; Henry, 2014).

Дробление эмбрионов улиток

Спираль — главный мотив в организме моллюсков. Эти животные закручены вокруг самих себя (Flusser, 2011). Действительно, раковины улиток представляют собой спирали, их личинки претерпевают скручивание на 180°, которое перемещает анус в переднее положение над головой, и, что самое важное, дробление их ранних зародышей тоже идет по спирали. **Спиральное голобластическое дробление** (см. рис. 1.9) характерно для нескольких групп животных, включая кольчатых червей, плоских червей и большинства моллюсков (Hejnol, 2010; Lambert, 2010). Плоскости первых делений спирально дробящихся эмбрионов не параллельны или перпендикулярны анимально-вегетативной оси яйца; скорее деления дробления происходят под косым углом, образуя спиральный рисунок расположения дочерних бластомеров. Бластомеры находятся в тесном контакте друг с другом, создавая термодинамически стабильные композиции, очень похожие на скопления мыльных пузырей. Кроме того, спирально дробящиеся эмбрионы обычно начинают гастрюляцию после относительно небольшого числа делений, что позволяет следить за траекторией каждой клетки бластулы. Если сравнить пути развития отдельных бластомеров эмбрионов кольчатых червей, плоских червей и моллюсков, то окажется, что гомологичные клетки образуют одни и те же структуры и пути их развития идентичны (Wilson, 1898; Hejnol, 2010). Таким образом, у спиралей существует строгая гомология развития бластомеров, а это редко можно наблюдать между разными типами. Бластула, образующаяся при спиральном дроблении, обычно имеет очень маленький бластоцель или не имеет его вовсе и носит название **стереобластулы**.

Моллюски, такие как ореховая двустворка и грязевая улитка (рис. 8.2A), демонстрируют типич-

¹ Жаберные дуги дают начало головным структурам у четвероногих, жабрам у рыб и фильтрующим структурам у ланцетников и оболочников.

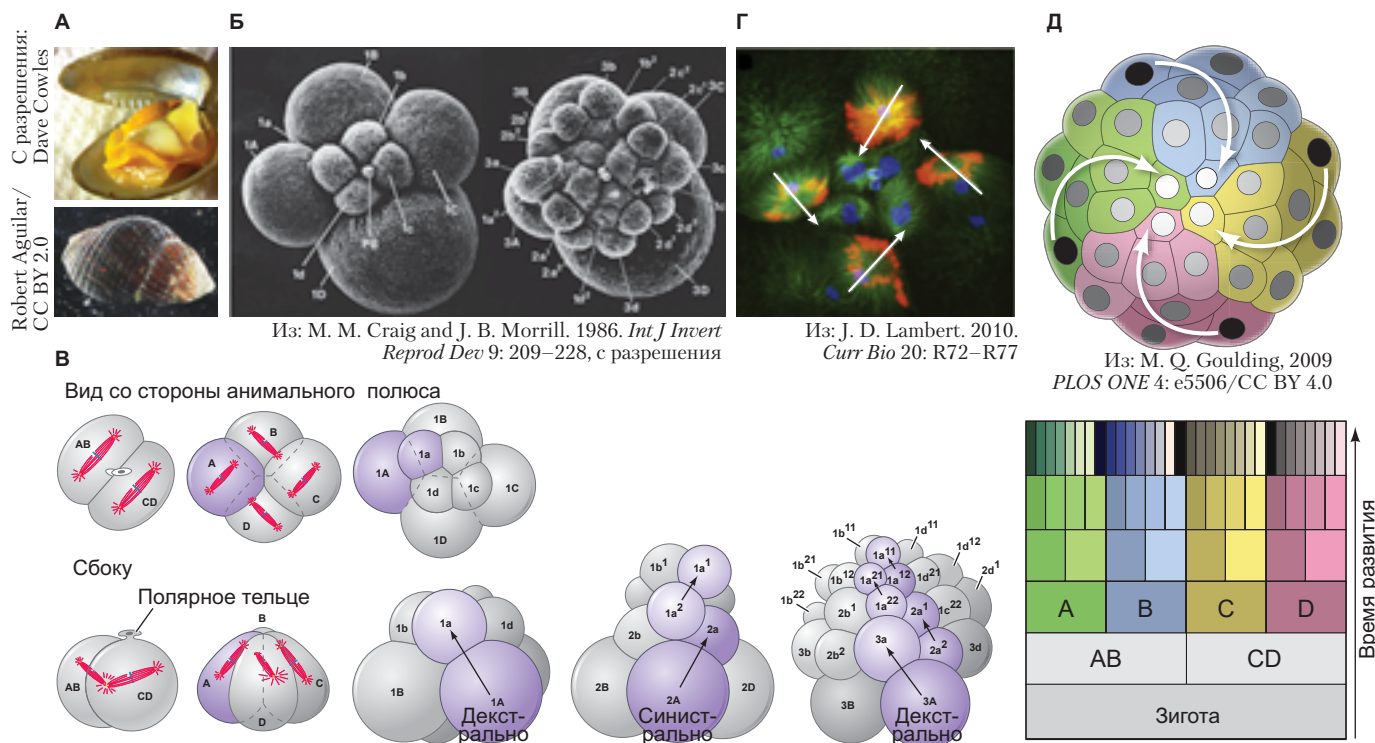


Рис. 8.2. Спиральный паттерн дробления у эмбрионов моллюсков. **А.** Ореховая двустворка (*Acila castrensis*; *вверху*) и грязевая улитка (*Ilyanassa obsoleta*; *внизу*). **Б.** Сделанные на сканирующем электронном микроскопе микрофотографии декстрального дробления у *I. obsoleta* на стадиях восьми (*слева*) и 32 клеток (*справа*). РВ — полярное тельце (осталось после мейоза). **В.** Схема спирального дробления улитки *Trochus*, вид с анимального полюса (*вверху*) и сбоку (*внизу*). Клетки, полученные из бластомера А, выделены цветом. Митотические веретена, нарисованные на ранних стадиях, делят клетки неравномерно и под углом к вертикальной и горизонтальной осям. Каждый последующий квартет микромеров (обозначены строчными буквами) смещается по часовой стрелке (декстрально) или против часовой стрелки (синистрально) относительно своих сестринских макромеров (обозначены заглавными буквами), создавая характерный спиральный паттерн (*стрелки*). **Г.** Вид с анимального полюса, показывающий сегрегацию РНК (*IoLR2*, *красный*) в микромеры второго квартета эмбриона *I. obsoleta*. Видны митотические веретена второго квартета, сместившегося синистрально (ДНК, *синий*; микротрубочки, *зеленый*). **Д.** Эта иллюстрация анимального полюса эмбриона спиралии показывает каждую генеалогическую ветвь, восходящую к четырем бластомерам (квартиль) в разных цветах, с разными оттенками для каждого цвета, представляющими клоны первого (*светлые*) и второго кварталов (*темные*). Генеалогия бластомеров показана также ниже в виде блок-схемы, чтобы подчеркнуть симметричное происхождение каждого клона микромеров

ное спиральное голобластическое дробление. Как и у многих эмбрионов моллюсков, первые два деления дробления проходят почти **меридианально** (поперек экваториальной плоскости) и образуют четыре больших **макромера** (обозначены А, Б, В и Г; рис. 8.2Б, В). У многих видов четыре бластомера имеют разные размеры (Г самый большой), что позволяет легко их идентифицировать (рис. 8.2Б). Другой интересный аспект дробления моллюсков заключается в том, что при любом последующем делении каждый макромер отделяет небольшой **микромер** на своем анимальном полюсе таким образом, что образующийся квартет микромеров несколько смещается относительно макромеров. Смещения вправо и влево чередуются в последовательных делениях,

что приводит к характерному спиральному паттерну клеток, квартетами уложенных друг на друга (следуйте стрелкам на рис. 8.2В). При взгляде на эмбрион с анимального полюса видно, что верхние концы митотических веретен чередуют ориентацию по часовой стрелке и против часовой стрелки (рис. 8.2Г). Это приводит к тому, что группы микромеров отделяются то слева, то справа от их родительских клеток. Такой способ дробления приводит к четырем «квadrантным линиям», расположенным по спирали вокруг анимально-вегетативной оси (рис. 8.2Д; Goulding, 2009). В нормальном развитии микромеры первого квартета — структуры головы, микромеры второго квартета образуют статостист (орган равновесия) и раковину, а микромеры третьего кварте-

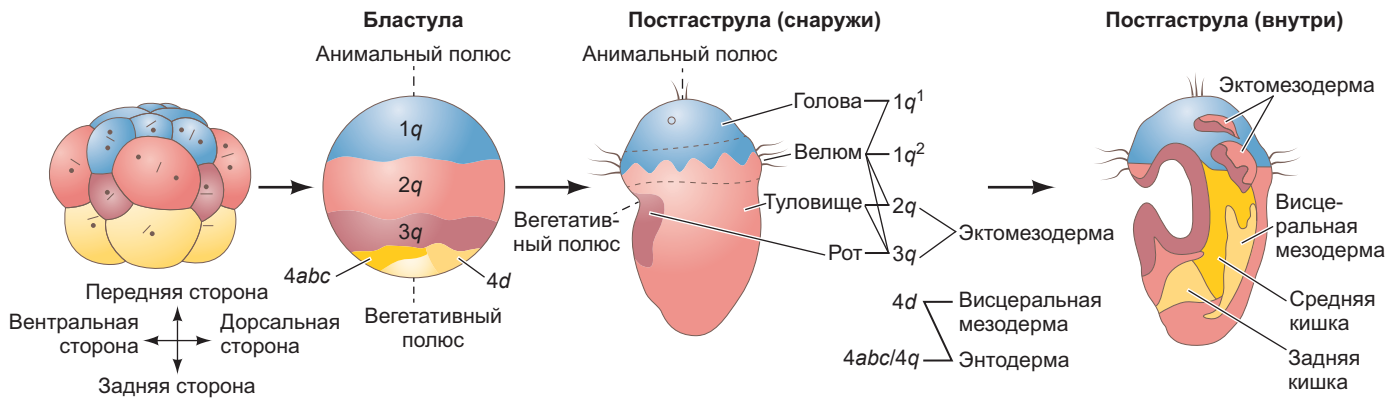


Рис. 8.3. Карта презумптивных зачатков эмбриона спиралии в ходе гастрুলации. Четкое распределение детерминант вдоль анимально-вегетативной оси соответствует эктодермальной, висцерально-мезодермальной и энтодермальной линии развития клеток. Различные квартеты микромеров обозначены как q ; получены из квартета $1q$ клетки $1q^1$, $1q^2$. Важно отметить, что ротовое отверстие развивается непосредственно перед бластопором и образуется на вентральной поверхности. (По данным: J. D. Lambert, 2010. *Curr Biol* 20: 272–277.)

та оказываются перед бластопором на вентральной стороне и образуют рот (рис. 8.3; Lambert, 2010). Эти пути развития обусловлены как локализацией цитоплазматических факторов, так и региональными индукционными сигналами (Cather, 1967; Clement, 1967; Render, 1991; Sweet, 1998).

Материнская регуляция дробления улиток

Ориентацию плоскости дробления влево или вправо контролируют цитоплазматические факторы в ооците. Это было обнаружено путем анализа нарушений закрученности раковины улиток. У одних улиток раковина закручена вправо, если смотреть с вершины, и открывается с правой стороны (**правозакрученность**, или **декстральность**), тогда как раковины других улиток закручены влево и открываются слева (**левозакрученность**, или **синистральность**). Обычно направление закрученности одинаково для всех особей данного вида, но иногда встречаются мутанты (т. е. в популяции правозакрученных улиток можно обнаружить особей с левозакрученной раковиной). Крэмpton (1894) проанализировал эмбрионы таких аномальных улиток и обнаружил, что их раннее дробление отличается от нормы (рис. 8.4). У левозакрученных улиток ориентация клеток после второго деления дробления отличалась в результате измененной ориентации митотического аппарата. На рис. 8.4 видно, что положение бластомера $4d$ различно у эмбрионов улиток с право- и левозакрученными раковинами. Бластомер $4d$ (его часто называют **мезентобластом**) особенный, так как его потомство образует большинство мезодермальных органов (сердце, мышцы, первичные половые клетки) и энтодермальные органы (кишечная трубка).

У таких улиток, как *Radix* (прудовик, ранее известный как *Lymnaea*), направление закрученности раковины контролирует одна пара генов (Sturtevant, 1923; Boycott, et al., 1930; Shibasaki, 2004). Левозакрученные мутанты *Radix peregra* были обнаружены и скрещены с нормальными правозакрученными улитками. Скрещивания показали, что аллель правозакрученности D доминантен по отношению к аллелю левозакрученности d . Однако направление дробления обусловлено не генотипом развивающейся улитки, а генотипом матери. Это называют **материнским эффектом**. (Мы увидим другие важные гены материнского эффекта, когда будем обсуждать развитие *Drosophila*.) Улитка-самка dd может производить только левозакрученное потомство, даже если генотип этого потомка — Dd . Особь с генотипом Dd может быть как левозакрученной, так и правозакрученной, в зависимости от генотипа матери. В результате схемы скрещивания выглядят так:

Генотип P	Генотип F_1	Фенотип F_1
самка DD × самец dd	→ Dd	Все правозакрученные
самка dd × самец DD	→ Dd	Все левозакрученные
Dd × Dd	→ $1DD:2Dd:1dd$	Все правозакрученные

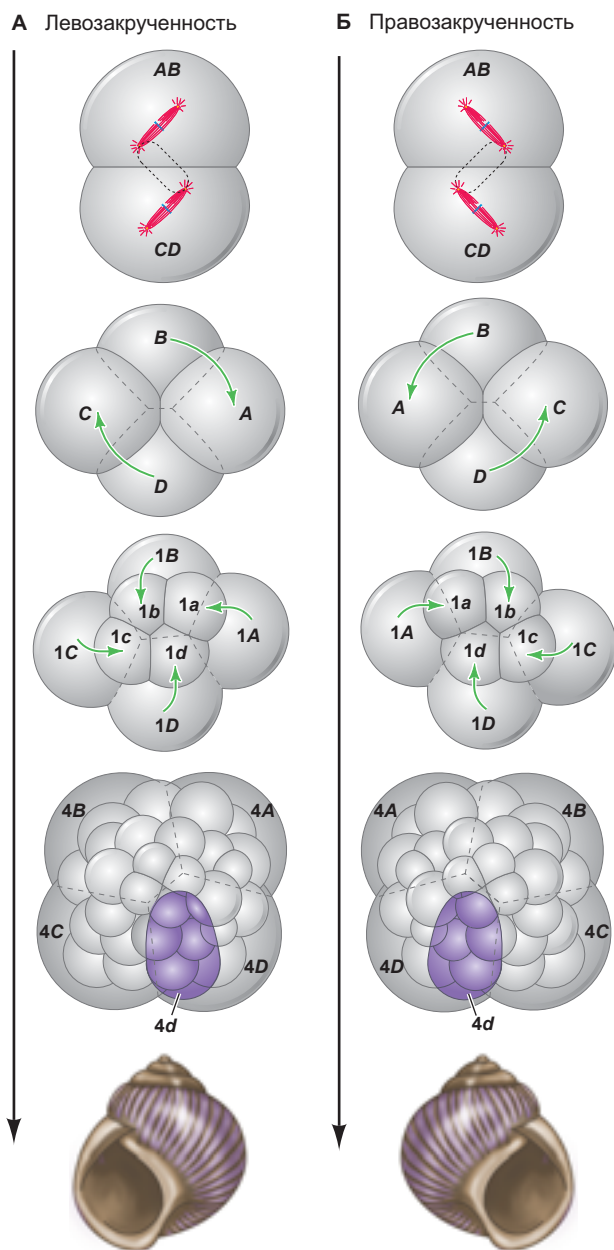
Таким образом, именно генотип **яичника**, в котором развивается ооцит, определяет, какое направление примет дробление. Генетические факторы, вовлеченные в закручивание, передаются эмбриону цитоплазмой ооцита. Когда Фримен и Лунделиус (1982) вводили небольшое количество цитоплазмы от правозакрученной улитки в яйца матерей dd , полученные эмбрионы были правозакрученными. Однако цитоплазма левозакрученных улиток **не вли-**

Рис. 8.4. Декстральная и синистральная закрученность у улиток. Вид с анимального полюса левозакрученной (А) и правозакрученной (Б) улиток. Происхождение синистральной и декстральной закрученности можно проследить до ориентации митотического веретена на третьем делении дробления. Лео- и правозакрученные улитки развиваются как зеркальное отображение друг друга. (По данным: Т. Н. Morgan, 1927. *Experimental Embryology*. Columbia University Press: New York, based on E. G. Conklin, 1903. *Anat Anz* XXIII: 231577–231588.)

яла на правозакрученные эмбрионы. Эти результаты подтвердили, что матери дикого типа «помещали» в свои яйца некий фактор, который отсутствовал или был дефектным у матерей *dd*. Описанные эксперименты, среди прочего, предоставили одни из первых доказательств существования цитоплазматических детерминант и заложили основу для долгого пути выявления этих таинственных факторов.

Большой прорыв произошел, когда две группы, работающие с такими популяциями улиток, независимо идентифицировали и картировали ген, кодирующий белок формин, который активен в яйцах матерей, несущих аллель *D*, но не в яйцах матерей *dd* (рис. 8.5А, Б; Liu et al., 2013; Davison et al., 2016; Kuroda et al., 2016). Матери *DD* и *Dd* продуцируют активные белки формина. Однако у самок *dd* ген *formin* имеет в кодирующей области мутацию со сдвигом рамки, что делает его мРНК нефункциональной и быстро деградирующей. Когда яйцеклетка содержит функциональную мРНК формина из *D*-аллеля матери, транскрипт уже на двухклеточной стадии распределяется в эмбрионе асимметрично. Белок формин, кодируемый этой мРНК, связывается с актином и помогает выравнивать цитоскелет. Данные результаты подтверждают исследования, показывающие, что лекарства, которые ингибируют формины, вызывают развитие левозакрученных эмбрионов из яйцеклеток матерей *DD*.

Первым признаком того, что клетки будут делиться синистрально, а не декстрально, является спиральная деформация клеточных мембран на дорсальном конце макромеров (рис. 8.5В). Как только происходит третье деление дробления, белок Nodal (паракринный фактор суперсемейства TGFβ) активирует гены на правой стороне правозакрученных эмбрионов и на левой стороне левозакрученных эмбрионов (рис. 8.6А). При изменении направления дробления на восьмиклеточной стадии с помощью стеклянных игл изменяется локализация экспрессии гена *nodal* (Grande and Patel, 2009; Kuroda et al., 2009; Abe et al., 2014). Nodal, по-видимому, экспрессируется в микромерах С-квадранта (дающих начало эктодерме) и индуцирует асимметричную экспрессию гена фактора транскрипции Pitx1 (который тоже служит мишенью Nodal в формировании осей тела позвоночных) в соседних бластомерах D-квадранта (рис. 8.6Б).



РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Развивая спиральный паттерн: взгляд с точки зрения растений

Мы завершили анализ того, как пространственная упорядоченность делений дробления во время раннего развития приводит к приобретению определенной закрученности раковины у улиток. Органы растения, например листья или части цветка, демонстрируют удивительно схожий паттерн повторяющихся органов, регулярно расположенных вокруг растущего побега или стебля. Один из наиболее узнаваемых паттернов в природе — спиральное расположение листьев суккулентов или желтых цветочков в центре соцветия ромашки

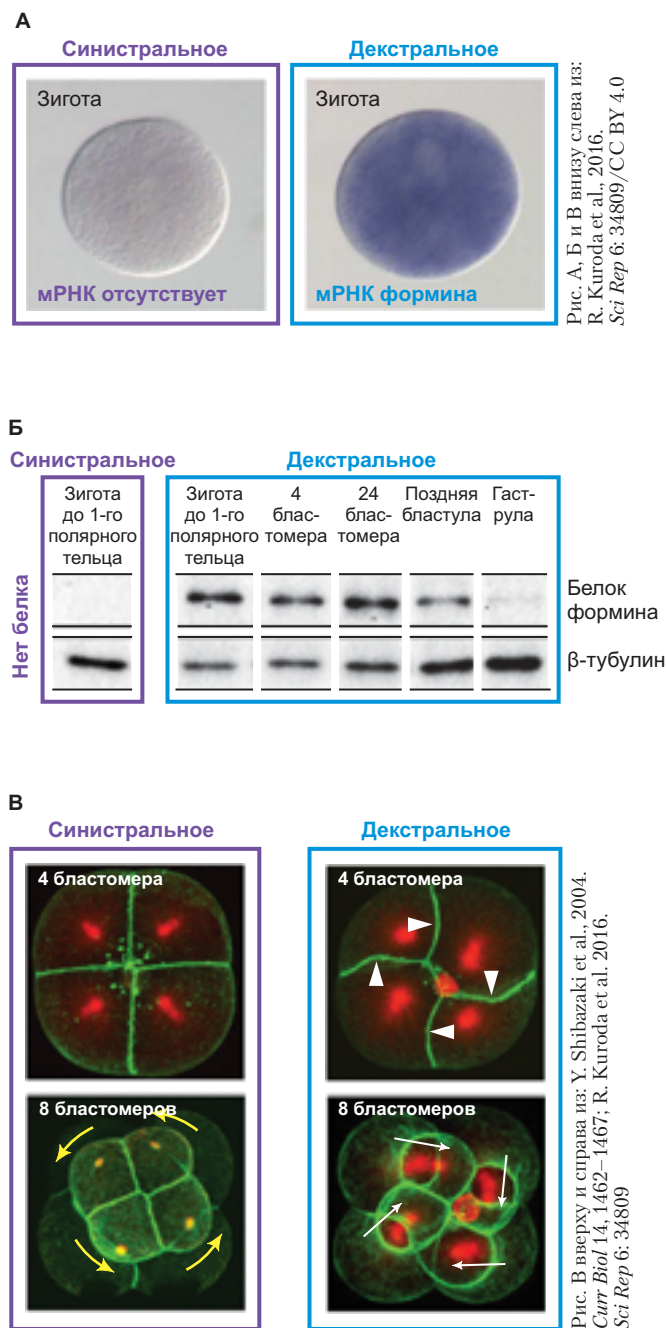


Рис. 8.5. Ген *formin* контролирует лево- и правозакрученность на третьем делении дробления. Левозакрученная (синистральная) линия улитки *Radix stagnalis* показывает полную потерю материнской мРНК (А) и белка (Б) гена *formin* в зиготе по сравнению с линией с правозакрученной (декстральной) раковиной. Окрашивание на выявление актина (зеленый) и микротрубочек (красный) показывает спиральную деформацию (белые стрелки) на третьем делении дробления в нормальном паттерне дробления у декстральных эмбрионов, по сравнению с аномальным дроблением у синистральных эмбрионов. Белые стрелки обозначают ориентацию веретена, желтые указывают направление смещения бластомеров (В).

(рис. 8.7А) — соответствует математической определенности последовательности Фибоначчи, как и форма раковины наutilus. Как же определяется этот спиральный паттерн клеточных судеб?

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИЛЛОТАКСИСА

Регулярное расположение листьев вдоль стебля растения называется **филлотаксисом** (от греч. φύλλον — лист; τάξις — порядок) и настолько предсказуемо, что служит важным признаком для определения растений. Филлотаксис растения обусловлен положением новообразованных листовых зачатков вокруг апикальной меристемы побега. Расположение других органов растений (например, цветов) аналогичным образом определено паттерном формирования зачатков. Принципы развития, лежащие в основе филлотаксических паттернов, активно исследуют на модельном растении *Arabidopsis thaliana*. У *A. thaliana* есть три варианта расположения боковых органов: **крестообразное**, в котором последовательные супротивно расположенные пары органов смещены на 90° (как в случае семян и первой пары вегетативных листьев); **спиральное**, в котором органы последовательно появляются вокруг вершины в соответствии с «золотым углом» Фибоначчи $137,5^\circ$ между каждым органом (например, вегетативные листья и цветы в соцветии); и **мутовчатое**, в котором комплект органов одновременно появляется в кольце вокруг вершины (например, части цветка) (рис. 8.7Б; Palauqui and Laufs, 2011). Чтобы выявить аналогии с рассмотренным ранее спиральным дроблением улиток, мы сосредоточим внимание на основных механизмах спирального развития в меристеме соцветия.

НАПРЯЖЕНИЯ В МЕРИСТЕМЕ СОЦВЕТИЯ

Вспомните, что меристема соцветия представляет собой специализированную нишу стволовых клеток, в которой в результате деления и растяжения клеток образуются боковые зачатки, предназначенные для формирования новых цветов. Зачатки окружают вершину меристемы и постепенно смещаются по мере образования новых клеток на вершине (рис. 8.7В). Возникающий спиральный паттерн контролируют биофизические свойства меристемы и механизмы, регулирующие транспорт гормона ауксина, которые вместе создают удивительную самоорганизующуюся систему межклеточных взаимодействий.

Чтобы понять принципиальную роль биофизических свойств меристемы в создании спирального паттерна цветочных почек, необходимо вспомнить, что рост растений происходит за счет растяжения

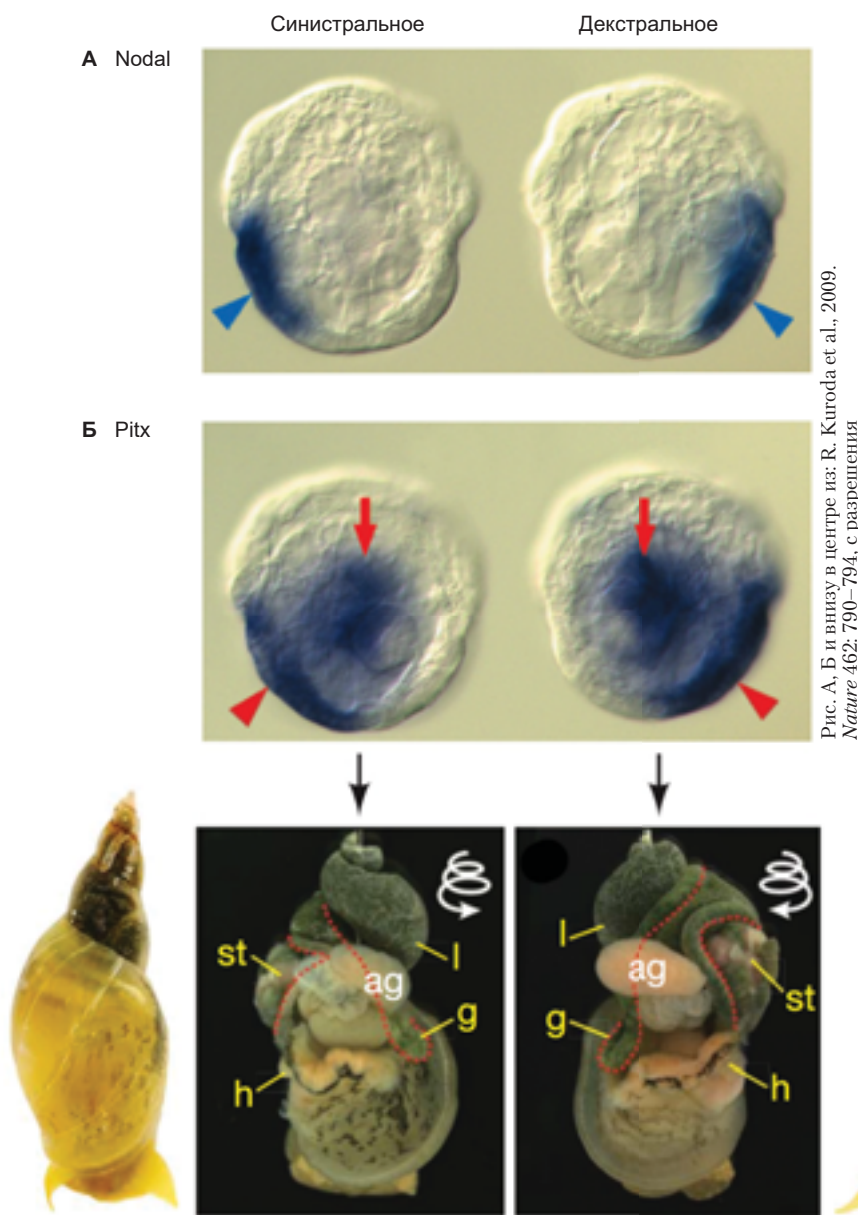


Рис. А, Б и внизу в центре из: R. Kuroda et al., 2009. *Nature* 462: 790–794, с разрешения

Рис. 8.6. Механизмы правосторонней и левосторонней закрученности раковины улиток. **А.** У эмбриона Nodal (синий) активируется в раковинной железе (синяя стрелка) на левой стороне синистральных эмбрионов и на правой стороне декстральных эмбрионов. **Б.** Транскрипционный фактор Pitx1, наблюдаемый асимметрично в раковинной железе (красные стрелки) и висцеральной массе (красные стрелки) эмбриона (верхнее изображение; синий), отвечает за формирование органов, как видно на вентральной стороне декapsулированных взрослых улиток (нижнее изображение). Обозначено положение следующих органов: ag — белковая железа; g (обведено пунктирной красной линией) — кишка; h — сердце; l — печень; st — желудок. Белая спиральная стрелка в верхнем правом углу показывает направление закрученности против часовой стрелки (слева) и по часовой стрелке (справа)

Рис. Б внизу, слева и справа из: R. Kuroda et al., 2016. *Sci Rep* 6: 34809/CC BY 4.0

растительных клеток. Более того, поскольку растительные клетки не могут двигаться независимо от своих соседей, это растяжение создает механические нагрузки на окружающие клетки (как если вы вытянете руки в стороны, то неизбежно толкнете студентов, сидящих рядом). Эти напряжения могут оказывать драматическое влияние на структурные свойства растительной клетки. Особое значение имеет удивительная способность клеток апикальной меристемы к ремоделированию своих клеточных стенок в ответ на физические (растягивающие) силы (Shapiro et al., 2015), которая может определять ориентацию клеточного растяжения. Зависимое от силы ремоделирование клеточной стенки происходит в два этапа:

1. Кортикальные микротрубочки (те, которые находятся непосредственно под клеточной мем-

браной) переориентируются перпендикулярно оси наибольшего напряжения.

2. Затем эти микротрубочки становятся каркасом для ориентации новых целлюлозных микрофибрилл, добавляемых к клеточной стенке во время ремоделирования.

Ориентация целлюлозы в клеточной стенке определяет направление, в котором клетка может расширяться (рис. 8.8А). Выровненные целлюлозные волокна создают **механическую анизотропию** на стенке; иными словами, клеточная стенка растягивается не одинаково во всех направлениях. Когда целлюлоза уложена параллельно напряжению, возникает сопротивление растяжению клетки вдоль оси напряжения; когда же целлюлоза уложена перпендикулярно, удлинение возможно (Bidhendi and Geitmann, 2016). Так цитоскелет

и клеточная стенка могут влиять на рост отдельной клетки, но как эта система может быть использована для организации морфогенетического события на уровне ткани, такого как рост нового зачатка цветка?

Теперь представим клетки внутри зарождающегося бокового зачатка. Масса клеток должна давить на вышележащий эпидермальный слой и растягивать его, формируя новый цветочный зачаток; чтобы такой рост имел место, стенки клеток эпидермиса должны быть способны растягиваться (рис. 8.8Б). Растяжение достигается за счет локализованной дезорганизации кортикальных микротрубочек (до изотропного состояния) в клетках эпидермиса на вершине зачатка, тогда как в клетках на границе и периферических участках меристемы происходит анизотропное распределение (рис. 8.8В, Г). Дезорганизованность кортикальных микротрубочек в апикальных клетках означает, что целлюлозные микрофибриллы в их стенках тоже рандомизированы, что снижает устойчивость к увеличению

клеток на вершине зачатка (помните, что это биофизическое изменение формы на уровне ткани). Возникает следующий логический вопрос: как эти дезорганизованные микротрубочки остаются локализованными в определенных клетках? Предполагается, что ауксиновая сигнализация индуцирует эту локализацию, которая затем регулирует положение боковых зачатков.

СПИРАЛЬНЫЕ ПАТТЕРНЫ ИЗ ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

Как мы подробно описали в гл. 4, ауксин способствует растяжению клеток и росту тканей. В отличие от морфогенов животных, ауксин распространяется не путем простой диффузии, а скорее направляется к определенным областям посредством асимметричной локализации выводящих ауксин переносчиков PIN (см. рис. 4.29 и 4.30; Bhatia and Heisler, 2018). Направленные потоки ауксина важны для формирования боковых органов,

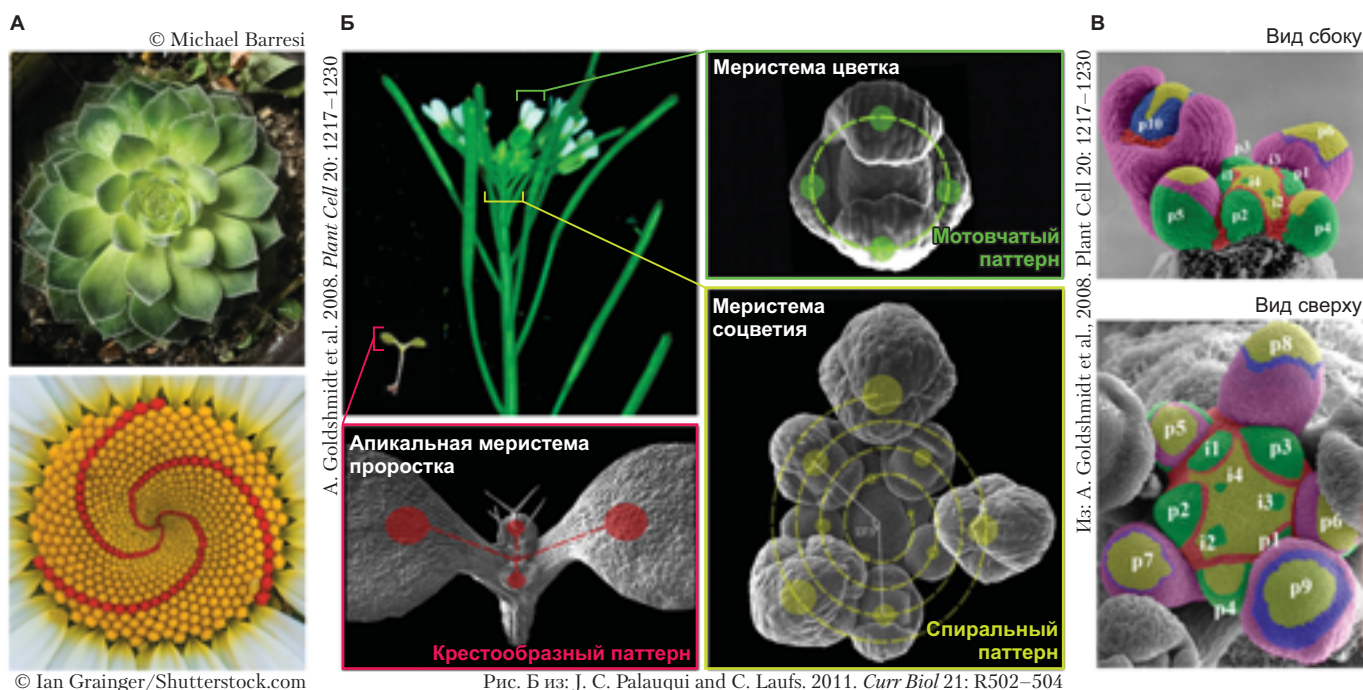


Рис. 8.7. Апикальная меристема побега формирует паттерны филлотаксиса у растений. **А.** Вид сверху на суккулентное растение «сахарная вата» и центр соцветия ромашки. В ромашке 21 ряд цветочков; три равноудаленных ряда окрашены в красный цвет, чтобы подчеркнуть спиральное расположение цветочков. **Б.** Боковые органы *Arabidopsis thaliana* подразделяют на три типа: крестообразные, мутовчатые и спиральные. Только первая пара органов побегов, следующих за семядолями, образует крестообразный паттерн; расположение всех последующих листьев у *A. thaliana* происходит по спиральной схеме. **В.** Микрофотографии меристемы соцветия, вид сбоку и сверху, полученные на электронном сканирующем микроскопе. Изображения размечены псевдоцветами, чтобы проиллюстрировать области спецификации клеток в пределах вершины меристемы и в развивающихся цветочных почках. Зачатки обозначены от самых молодых до самых старых (*p1*, *p2*, *p3* и т. д.). Зарождающиеся зачатки (*i1*, *i2* и т. д.) отмечены в областях меристемы, где специфицируются презумптивные зачатки

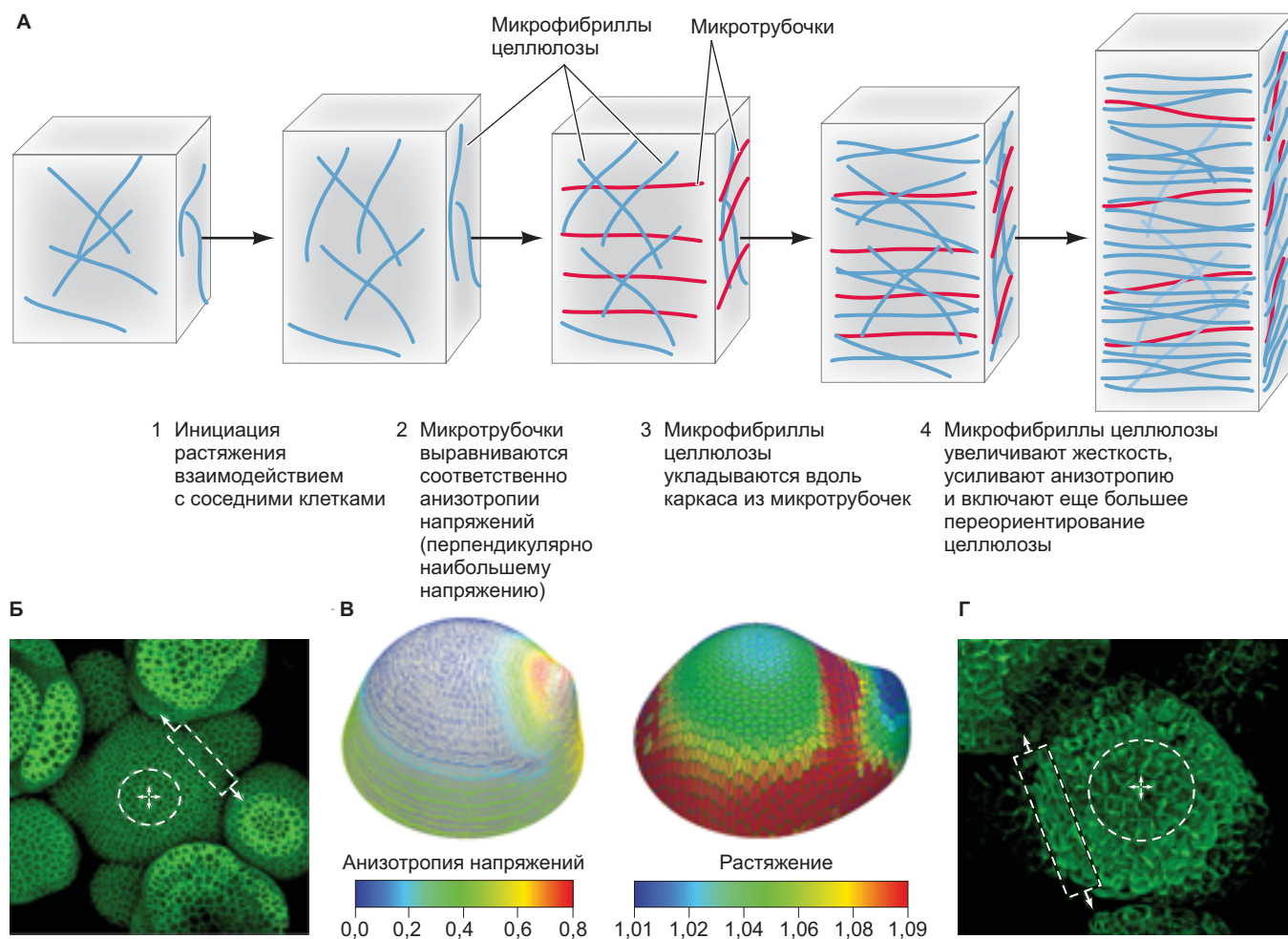


Рис. Б–Г из: A. Sampathkumar et al., 2014. *Curr Biol* 24: R475–R483; рис. В справа по данным: B. Bozorg et al. *PLoS Comput Biol* 10: e1003410/CC BY 4.0

Рис. 8.8. Организация микротрубочек и целлюлозных микрофибрилл в ответ на механическое напряжение контролирует направление распространения клеток. **А.** Схематичная модель того, как микротрубочки и целлюлозные микрофибриллы реагируют и усиливают анизотропный рост (разные величины роста по разным осям) в клетках растений. Расширение вновь сформированной растительной клетки будет зависеть от асимметрии в жесткости клеточной стенки и от сил, передаваемых через контакты с соседними клетками (1). Асимметричный рост растительной клетки вдоль одной оси по отношению к другой приведет к нескольким усиливающим эффектам, способным закрепить это анизотропное расширение. Клетка будет немедленно реагировать на нагрузки, создавая перпендикулярно выровненные массивы микротрубочек (2). Затем массивы направляют укладку целлюлозных микрофибрилл, ориентирующих параллельно каркасу микротрубочек (3). Такая архитектура создает повышенное анизотропное напряжение, которое положительно влияет на систему, что приводит к большему отложению целлюлозы и дальнейшему ускорению распространения клеток вдоль той же оси (4). **Б.** Цветочные зачатки, выходящие из верхушечной меристемы побега. Клетки на вершине меристемы (*пунктирная окружность*) имеют равномерное распределение сил напряжения, в то время как клетки на границах с новыми зачатками (*пунктирная рамка*) анизотропны. **В.** Силы напряжения могут быть измерены через апикальную меристему побега, и модели, подобные показанной здесь, помогают визуализировать, как анизотропные силы коррелируют с изначальным ростом (*справа*). **Г.** Микротрубочки (*зеленые*) в клетках на вершине апикальной меристемы побега (*пунктирная окружность*) расположены случайным образом, тогда как в клетках на периферии меристемы (и граница с зачатком) (*пунктирная рамка*) организованы перпендикулярно апикально-базальной оси меристемы (и зачатка). (Рис. А по данным: A. J. Bidhendi and A. Geitmann, 2016. *J Exp Bot* 67: 449–461.)

о чем свидетельствуют мутанты *A. thaliana* по гену *pin1*, формирующие лишь простой цилиндрический стебель без зачатков органов (рис. 8.9А). Однако местное нанесение ауксина на апикальную меристему *pin1*-мутанта достаточно для восстановления образования зачатков в этом месте (рис. 8.9А; Reinhardt et al., 2003). Во время нормального развития переносчики PIN1 располагаются так, что несколько клеток одновременно направляют ауксин в одну центральную точку конвергенции. Эта точка, накапливающая ауксин из всех клеток вокруг нее, становится центром нового зачатка. Что заставляет клетки позиционировать свои белки PIN1 таким образом? Клетки с высокими концентрациями ауксина каким-то образом воспринимаются соседними клетками, что приводит к перераспределению их выводящих ауксин переносчиков PIN в направлении максимума ауксина (рис. 8.9Б; Heisler et al., 2005; Bhatia et al., 2016). Ключевым компонентом этой положительной обратной связи является MONOPTEROS (известный также как AUXIN RESPONSE FACTOR 5, или ARF5), регулируемый ауксином фактор транскрипции ауксинового ответа. Увеличение экспрессии MONOPTEROS предшествует поляризации переносчиков PIN1 в клетках, соседствующих с клетками, которые уже экспрессируют MONOPTEROS, так что ауксин будет поступать из новой экспрессирующей MONOPTEROS клетки к точке конвергенции (рис. 8.9В). Созданная петля положительной обратной связи увеличивает концентрацию ауксина в точке конвергенции (Shapiro et al., 2015). Как максимум ауксина пропадает в направлении клеточной экспансии? Современная гипотеза о латеральной индукции органов основана на зависимом от ауксина ослаблении клеточных стенок в точке конвергенции (рис. 8.10). Все клетки растения связаны друг с другом, и когда часть клеточных стенок ослабляется, эта локальная механическая анизотропия (напряжение) ощущается окружающими клетками. Локализация PIN1 коррелирует с границами клеток с наибольшим напряжением; PIN1 локализуется в клетках, окружающих точку конвергенции, последовательно направляя поток ауксина к его максимуму (Heisler et al., 2010). Интригующее открытие, подтверждающее эту модель, заключается в том, что независимое разрыхление клеточных стенок (имитирующее предполагаемую роль ауксина) у *pin1*-мутанта само по себе способно вызывать рост бокового зачатка (Pien et al., 2001; Peaucelle et al., 2008; Sassi et al., 2014)!

Модель морфогено-механического стресса объясняет реципрокный паттерн последовательного формирования боковых органов у растений. По мере примордиального роста увеличится и механическое напряжение, вызванное ауксин-индуцированной экспансией клеток в апексе, которое

в итоге будет давать обратную связь для негативной регуляции ауксиновой сигнализации. Это возникает как запуск переориентации микротрубочек и целлюлозных микрофибрилл, которая стабилизирует клеточные стенки. Стабилизация ощущается соседними клетками, которые реагируют путем переполаризации PIN1 в направлении других максимумов ауксина в меристеме, стимулируя тем самым рост новых зачатков. Реципрокное взаимодействие между петлями положительной и отрицательной обратной связи, включающее морфогенетическую передачу сигналов ауксина и биофизические свойства меристемы, определяет положения новых зачатков, появляющихся из вершины побега. Такое расположение относительно роста побега вверх определяет спиральный паттерн филлотаксиса. Хотя образованный в результате спиральный паттерн спецификации клеток и органов в соцветии *A. thaliana* напоминает спиральную раковину улитки, он достигается с помощью другого механизма, включающего самоорганизующиеся межклеточные взаимодействия.



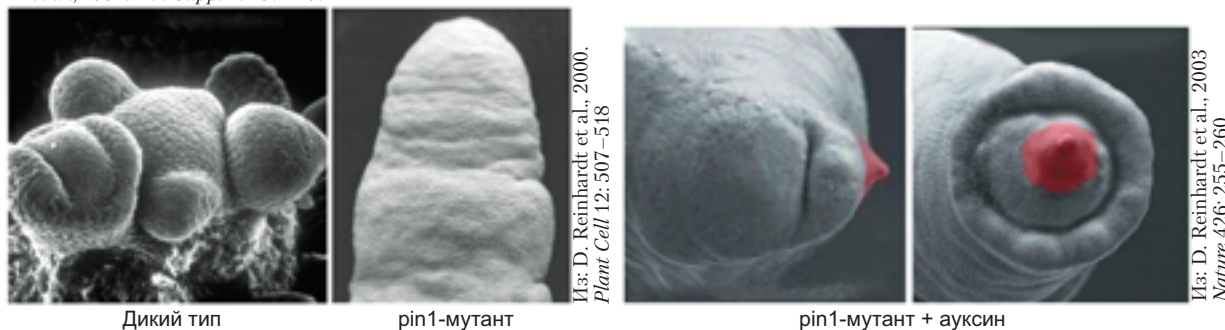
Загадки развития

Какое значение имеет, правый или левый? Быть правой или левой, может быть, не слишком существенно в жизни человека, но если ты улитка, это может быть критично как для отдельной особи, так и для эволюции популяции. Левозакрученные улитки предпочитают спариваться с левозакрученными, и наоборот — это исключительно вопрос положения гениталий и физического удобства. Более того, некоторые виды змей питаются улитками, и их челюсти более приспособлены для поедания правозакрученных улиток. Как эта эволюционная адаптация среди змей могла повлиять на эволюцию улиток в регионах, где виды сосуществуют? (Hoso et al., 2010.)

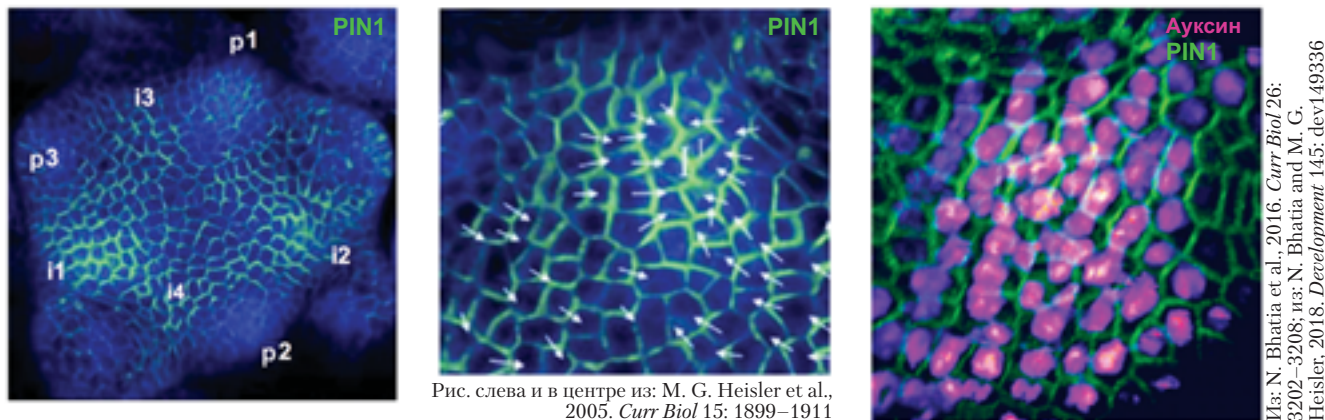
Детерминация осей эмбриона улиток

Моллюски предоставляют несколько наиболее ярких примеров автономного развития, в котором статус бластомеров определяют цитоплазматические детерминанты, расположенные в определенных областях ооцита (см. гл. 2). Автономная спецификация ранних бластомеров особенно выражена в тех группах животных, которые имеют спиральное дробление и у которых гастрюляция начинается на вегетативном полюсе на стадии всего нескольких десятков клеток (Lyons et al., 2015). У моллюсков мРНК для некоторых факторов транскрипции и паракринных факторов оказываются в отдельных клетках в результате ассоциации с определенными центросомами

A



Б



В

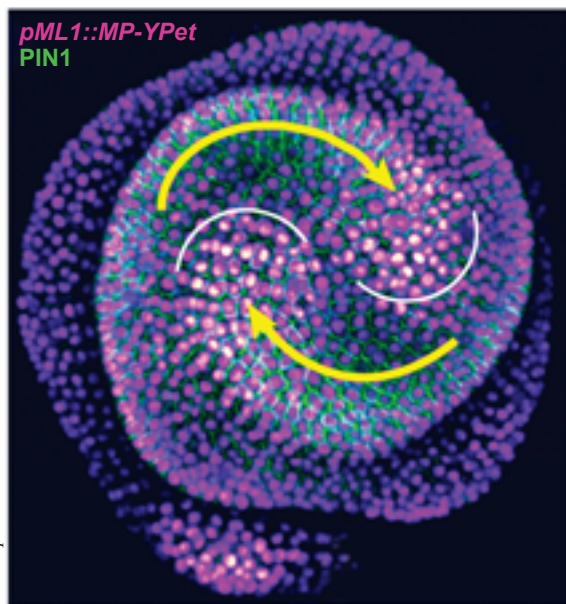


Рис. 8.9. PIN-опосредованный транспорт ауксина необходим для органогенеза в меристеме соцветия. **А.** Дефект гена *pin1* останавливает образование боковых органов меристемы соцветия (две левые микрофотографии со сканирующего электронного микроскопа). Однако местное нанесение ауксина (красное затемнение) на боковую поверхность или вершину меристемы *pin1*-мутанта может вызывать образование зачатка у источника ауксина (две правые микрофотографии). **Б.** Переносчики ауксина PIN1 поляризованы таким образом, чтобы распределить поток ауксина в зарождающиеся зачатки и способствовать их росту. Меристема соцветия на изображениях экспрессирует гибридный белок PIN1, сшитый с GFP. *Слева:* вид сверху на меристему соцветия, PIN1 виден как область зеленой флуоресценции, сосредоточенной на определенных сторонах мембраны клетки. p1–p3 — зачатки; i1–i4 — зарождающиеся зачатки. *В центре:* увеличенное изображение области i1. Поляризация PIN1 (отмечена белыми стрелками) ориентирована к центру зарождающегося зачатка (I). *Справа:* еще одно увеличенное изображение области i1. Предполагаемая активность ауксина визуализирована с помощью ратиометрического ауксинспецифического сенсора (R2D2). PIN1 (зеленый) ориентирован в сторону от краев зачатка к его центру на самом кончике, где обнаруживается наибольшая активность ауксина. Пурпурный цвет обозначает низкую активность ауксина, белый — высокую. **В.** У *monopteros*-мутанта экспрессия MONOPTEROS (MP) присутствует только в эпидермисе (*pML1::MP-YPet*), что приводит к формированию единственного непрерывного спиралевидного зачатка. Апикальная меристема побега на этом изображении получена из растения-мутанта, у которого экспрессия MP отсутствует во всех клетках, кроме эпидермиса. Это изображение из цейтраферной видеозаписи показывает локализацию трансгенных репортеров MP (пурпурный) и PIN1 (зеленый) в эпидермисе. Максимум экспрессии MP формирует спираль с течением времени (белые кривые), а PIN1 следует позади (желтые стрелки)

Из: N. Bhatia and M. G. Heisler, 2018. *Development* 145: dev149336

(рис. 8.11; Lambert and Nagy, 2002; Kingsley et al., 2007; Henry et al., 2010a, b). Эта связь позволяет мРНК входить только в одну из двух дочерних клеток. Во многих случаях мРНК, которые вместе транспортируются в определенный ярус бластомеров, имеют 3'-хвосты, образующие очень похожие вторичные

структуры. Можно предположить, что идентичность ярусов микромеров в значительной степени контролируют 3'-нетранслируемые области (UTR) мРНК, которые прикрепляются к центросомам при каждом делении (рис. 8.12; Rabinowitz and Lambert, 2010). В других случаях молекулы разметки (все еще неиз-

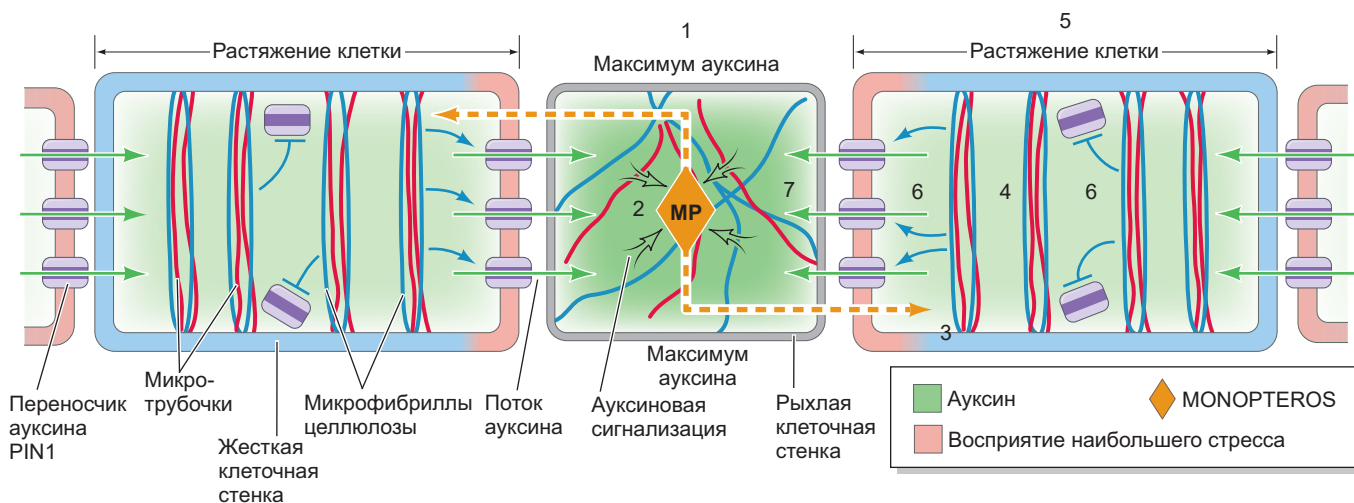
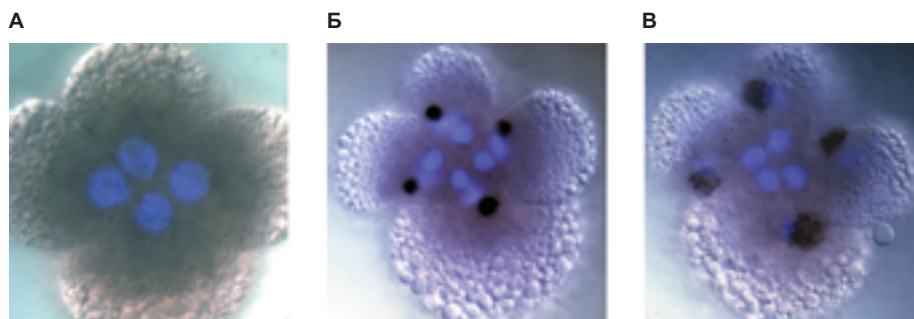


Рис. 8.10. Модель филлотаксиса по механизму обратной связи морфогено-механического стресса. (1) Клетка с максимальным содержанием ауксина имеет как самую слабую конструкцию клеточной стенки, так и наибольшую активацию фактора ответа на ауксин MONOPTEROS (MP, 2). Посредством неизвестных механизмов MP организует сборку микротрубочек в соседних клетках перпендикулярно источнику максимума ауксина (3). Эти микротрубочки используются в качестве основы для организации укладки микрофибрилл целлюлозы (4). Такая конфигурация клеточной стенки создает анизотропное растяжение клетки перпендикулярно целлюлозным микрофибриллам (5). Ослабленная клеточная стенка клетки максимума ауксина создает высокое напряжение на клеточных стенках клеток, непосредственно граничащих с ней (розовая клеточная стенка). В свою очередь анизотропное напряжение усиливает полярное распределение белков-переносчиков ауксина PIN1 в пограничных клетках по направлению к максимуму ауксина (6), что приводит к продолжению транспорта ауксина к месту его максимума (7)



Из: J. D. Lambert and L. M. Nagy. 2002.
Nature 420: 682–686, с разрешения

Рис. 8.11. Ассоциация мРНК *decapentaplegic* (*dpp*) со специфичными центросомами у улитки *I. obsoleta*. **А.** Гибридизация *in situ* для мРНК *dpp* у четырехклеточного эмбриона улитки не показывает накопления *dpp*. **Б.** На профазе третьего деления дробления мРНК *dpp* (черный цвет) накапливается в одной центросоме из пары, образующей митотическое веретено (ДНК показана светло-синим цветом). **В.** По мере того как митоз продолжается, мРНК *dpp*, по-видимому, присутствует в центросоме в макромере, но не в центросоме в микромере. ВМР-подобный паракринный фактор, кодируемый *dpp*, имеет большое значение в развитии моллюсков

вестные) кажутся связанными с определенной областью яйца, которая будет формировать уникальную структуру, названную полярной лопастью. **Полярная лопасть** представляет собой выпячивание на вегетативном полюсе зародыша, которое формируется, а затем исчезает. При первом делении дробления цитоплазма, поступающая в полярную лопасть, втягивается в бластомер CD; на втором делении дробления цитоплазма полярной лопасти включается в D-бластомер.

D-БЛАСТОМЕР

Развитие D-бластомера можно проследить на рис. 8.2Б–В. Макромер, получивший содержимое полярной лопасти, больше, чем остальные три (Clement, 1962). Если удалить D-бластомер или его первый или второй дочерний макромер (т. е. 1D или 2D), то разовьется неполноценная личинка, у которой не хватает сердца, кишечника, вельюма, раковины, глаз и ноги. По сути, формируется тот же фенотип, который можно наблюдать при удалении полярной лопасти. Поскольку D-бластомер не вносит непосредственный вклад во многие из этих структур, по-видимому, макромеры D-квадранта индуцируют другие клетки к такому развитию.

Если удалить 3D-бластомер вскоре после деления 2D-бластомера на 3D и 3d, образующаяся личинка выглядит так же, как и при удалении макромеров D, 1D или 2D. Однако удаление 3D-бластомера в более позднее время приводит к формированию нормальной личинки с глазами,



Загадки развития

Как анизотропные силы напряжения эпидермиса в меристеме вызывают изменения в PIN-полярности? Какое сходство вы видите между развитием спирального паттерна у растений и улиток? Можете ли вы представить себе бластулу улитки, работающую по принципу самоорганизации?

ногой, вельюмом и раковинной железой, но без сердца и кишечника. После деления 3D-бластомера на 4D и 4d удаление макромера 4D не приводит к качественным изменениям в развитии. Фактически, все детерминанты, необходимые для формирования сердца и кишечника, в это время находятся в 4d-бластомере (так называемом мезентобласте, как упоминалось ранее), и удаление этой клетки приводит к формированию личинки без сердца и кишки (Clement, 1986). Бластомер 4d впоследствии делится на два симметричных бластомера, которые дают начало мезодермальным (сердце) и энтодермальным (кишечник) органам (Lyons et al., 2012; Chan and Lambert, 2014).

Таким образом, мезодермальные и энтодермальные детерминанты из 3D-макромера переносятся в 4d-бластомер. По крайней мере две определяющие идентичность клеток детерминанты участвуют в регуляции развития 4d. Во-первых, статус этой клетки, по-видимому, обусловлен наличием фактора транскрипции **β-катенина**, который перемещается в ядро 4d-мезентобласта и его непосредственных потомков (рис. 8.13А; Henry et al., 2008; Rabinowitz et al.,

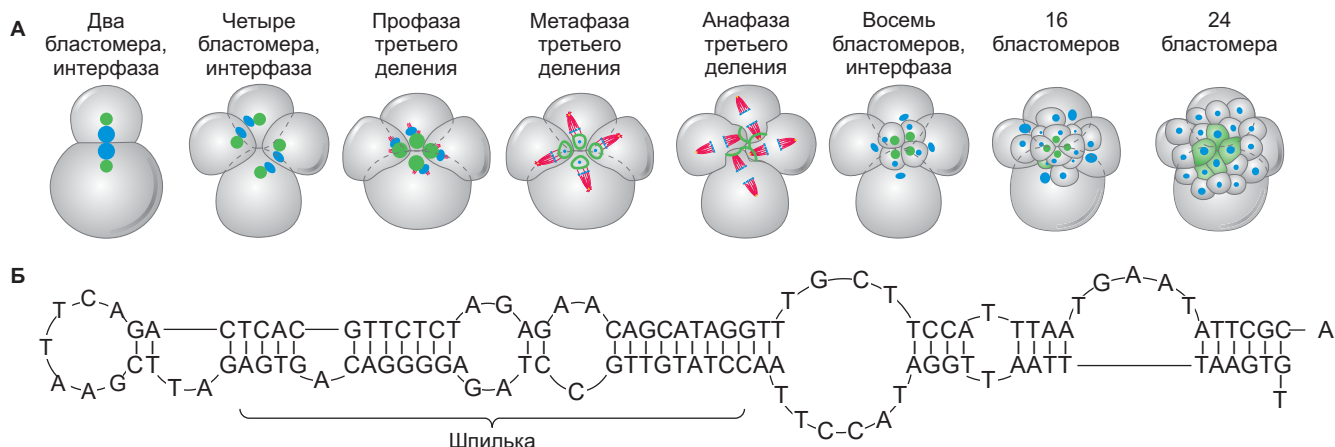


Рис. 8.12. Важность 3'-UTR для ассоциации мРНК со специфичными centrosомами. У *Ilyanassa* мРНК *R5LE* обычно концентрируется в первом ярусе микромеров. мРНК связывается с одной стороной centrosомного комплекса (стороной, которая окажется в маленьком микромере). **А.** Распределение мРНК *R5LE* в норме от двухклеточной до 24-клеточной стадии. мРНК (показана зеленым) ассоциируется с centrosомной областью (синяя), которая будет генерировать ярус микромеров и локализуется в определенных бластомерах на стадии 24 клеток. **Б.** Шпилька в области 3'-UTR мРНК *R5LE*. (По данным: J. S. Rabinowitz and J. D. Lambert, 2010. Development 137: 4039–4049.)

2008). Если подавить синтез белка β -катенина ингибиторами трансляции, 4d-бластомер будет иметь нормальный паттерн клеточных делений, но эти клетки не смогут дифференцироваться в сердце, мышцы или заднюю кишку; у таких эмбрионов не будет также происходить гаструляция (Henry et al., 2010a). Так, β -катенин может играть эволюционно консервативную роль в механизмах автономной спецификации и определении эндомезодермальных судеб по всему животному царству; в последующих главах мы узнаем о аналогичной роли этого белка у эмбрионов морского ежа и лягушки.

Мезентобласт 4d содержит также белок и мРНК супрессора трансляции *nanos* (рис. 8.13Б). Как и в случае с β -катенином, белок трансляции мРНК *nanos* предотвращает образование личиночных мышц, сердца и кишечника из 4d-бластомера (Rabinowitz et al., 2008). Кроме того, у личинок не образуются клетки половой линии (предшественники сперматозоидов и яйцеклеток). Как мы увидим, белок Nanos часто участвует в спецификации предшественников половых клеток.

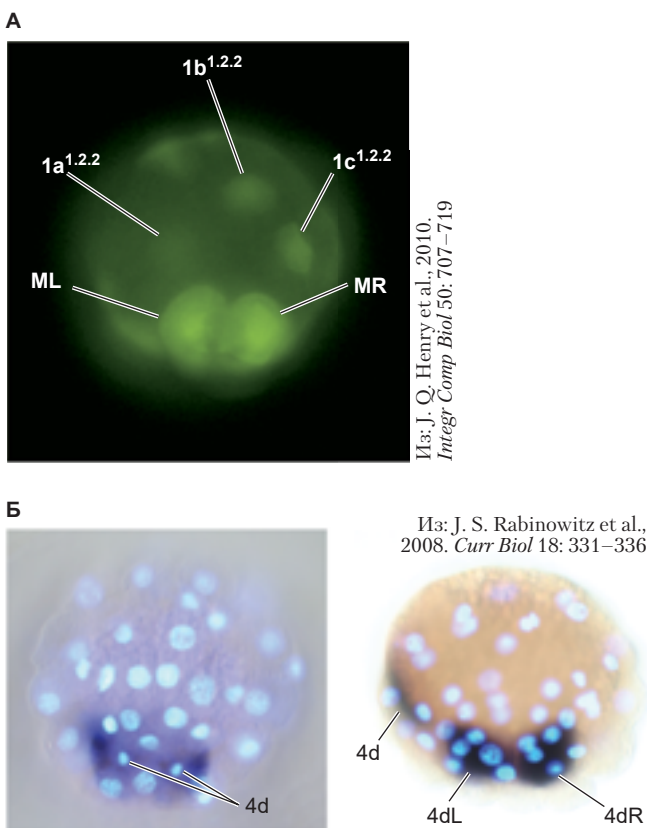


Рис. 8.13. Детерминанты, определяющие путь развития клеток в 4d-бластомере улитки. **А.** Экспрессия β -катенина в ML и MR, двух клетках (левой и правой), продуцируемых делением 4d-бластомера у *Crepidula*. **Б.** Локализация мРНК *nanos* (темно-фиолетового цвета) в делящемся 4d-бластомере и в его правом и левом потомках 4dR и 4dL у *Pyanassa* (ядра показаны светло-голубым)

Гаструляция у улиток

Стереобластула улитки относительно мала, и ее клеточные судьбы уже определены макромерами D-квартета. Гаструляция происходит в результате комбинации процессов, в том числе инвагинации энтодермы с образованием первичной кишки и эпителии микромеров анимальной шапочки, которые делятся и «окутыывают» вегетативные макромеры (Collier, 1997; van den Biggelaar and Dictus, 2004; Lyons and Henry, 2014). В конце концов микромеры покрывают весь эмбрион, оставляя небольшой щелевидный бластопор на вегетативном полюсе (рис. 8.14А). Микромеры первого — третьего квартета образуют эпителиальную анимальную шапочку, которая разрастается и покрывает вегетативные эндомезодермальные клетки. По мере сужения бластопора клетки, происходящие из 3a² и 3b², претерпевают эпителиально-мезенхимальный переход и перемещаются в архентерон. Позади них клетки-потомки бластомеров 3c² и 3d² претерпевают конвергенцию и растяжение, которое включает механизм, подобный застежке-молнии, и интеркаляцию по вентральной средней линии (рис. 8.14Б; Lyons et al., 2015).

Рот улитки образуется из клеток вокруг края бластопора. Анус возникает из клеток 2d², но они на короткое время становятся частью губы бластопора, потомство образует отдельное отверстие, не связанное с бластопором, которое и становится анусом. Таким образом, эти животные являются первичноротыми, так как формируют рот в области бластопора.

Нематода *C. elegans*

В отличие от улиток с их долгой эмбриологической историей, нематода *Caenorhabditis elegans* (обычно называемая *C. elegans*) является современной модельной системой, объединяющей биологию развития с молекулярной генетикой. В 1970-х гг. Сидни Бреннер искал организм, в котором можно было бы идентифицировать каждый ген, участвующий в развитии, а также проследить происхождение каждой клетки (Brenner, 1974). Круглые черви нематоды казались хорошей группой для начала экспериментов, потому что эмбриологи Ричард Гольдшмидт и Теодор Бовери уже показали, что некоторые виды нематод имеют относительно небольшое число хромосом и небольшое число клеток с инвариантной клеточной генеалогией.

Бреннер и его коллеги в итоге остановились на *C. elegans*, небольшой (длиной 1 мм) свободно живущей (т. е. непаразитической) почвенной нематоде с относительно небольшим числом типов клеток. Эмбриональное развитие *C. elegans* длится всего 16 ч и может проходить в чашке Петри (рис. 8.15А). Кроме того, его преобладающая взрослая форма гермафродитна, т. е. каждая особь

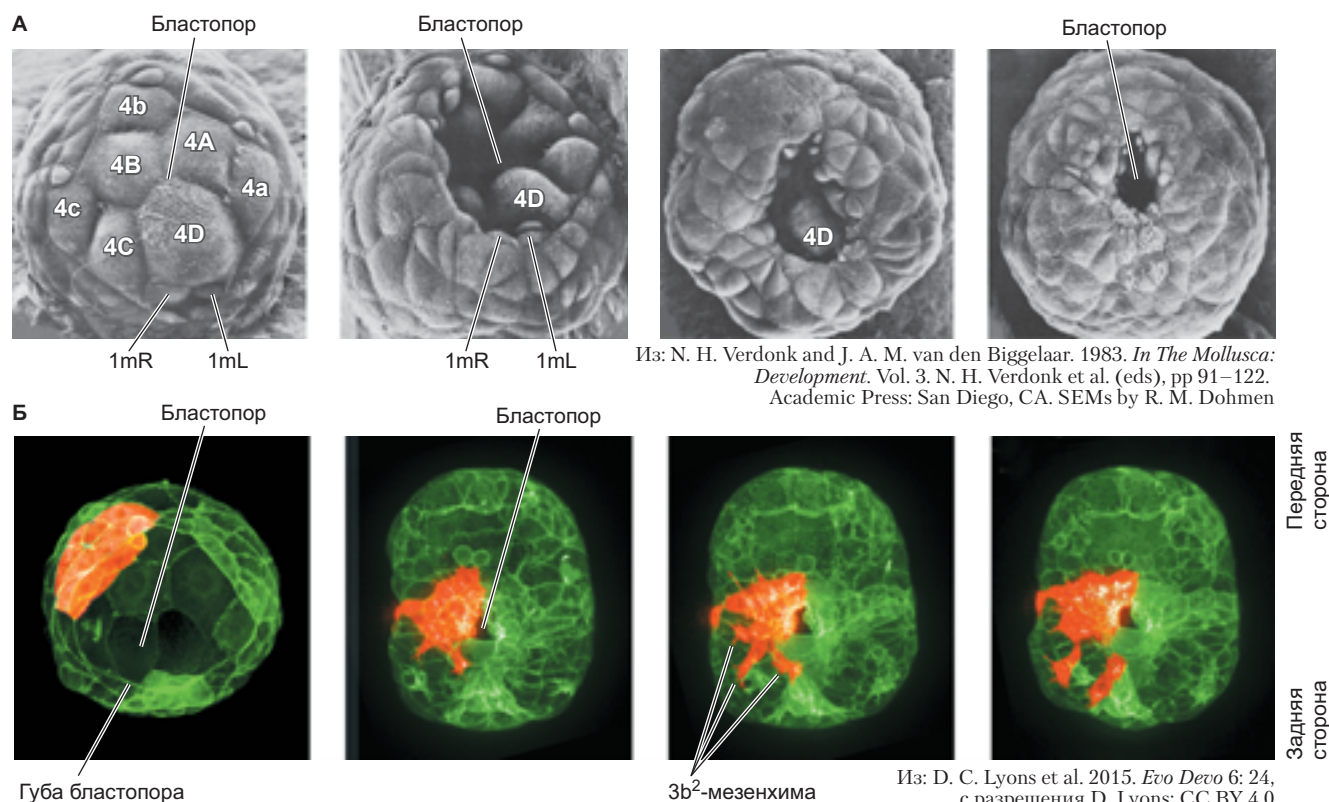


Рис. 8.14. Гастрюляция у улитки *Crepidula*. **А.** Микрофотографии, сделанные на сканирующем электронном микроскопе и сфокусированные на области бластопора, показывают интернализацию энтодермы, которая происходит из макромеров и четвертого яруса микромеров. 1mR и 1mL (правая и левая клетки мезентодермы соответственно) — потомки 4d-бластомера. Эктодерма путем эпиболии со стороны анимального полюса обрастает весь эмбрион. **Б.** Мечение живых клеток эмбрионов *Crepidula* показывает гастрюляцию путем эпиболии. Клетки-потомки 3b-микромера окрашены в *оранжевый* цвет

производит и яйца, и сперму. Эти круглые черви могут размножаться путем самооплодотворения либо путем перекрестного спаривания с изредка встречающимися самцами.

Тело взрослого гермафродита *C. elegans* содержит ровно 959 соматических клеток, и генеалогия всех клеток червя прослежена через его прозрачную кутикулу (рис. 8.15Б; Sulston and Horvitz, 1977; Kimble and Hirsh, 1979). Он имеет так называемую **инвариантную клеточную генеалогию**: число делений каждой конкретной эмбриональной клетки и образуемые ею клеточные типы детерминированы и одинаковы во всех эмбрионах. Это позволяет проследить, какие клетки имеют общих предшественников. Таким образом, для каждой клетки эмбриона мы можем точно сказать, как она появилась (т. е. какие клетки на более ранних стадиях эмбриона были ее предшественниками) и какие ткани она будет формировать. Кроме того, в отличие от клеточной генеалогии позвоночных, генеалогия *C. elegans* почти полностью инвариантна между отдельными особями; здесь мало места для случайности (Sulston et al., 1983). *C. elegans* имеет очень компактный геном и стал первым полностью секвенированным организмом среди многокле-

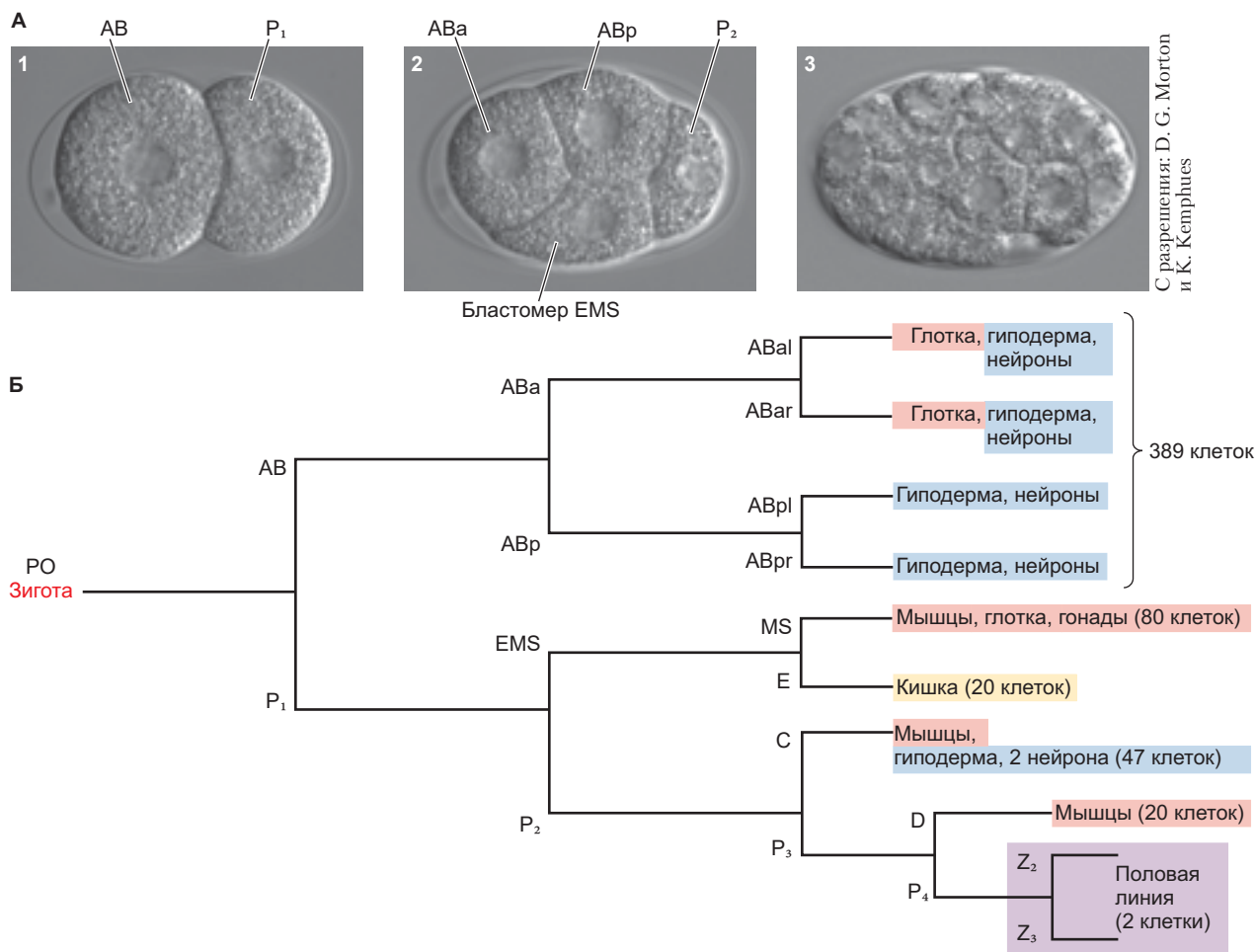
точных (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Несмотря на то что в геноме этой нематоды примерно столько же генов, сколько у человека (у *C. elegans* 19 000–20 000 генов; у *Homo sapiens* 20 000–25 000), по числу пар нуклеотидов он составляет только около 3% от человеческого (Hodgkin et al., 1998; Hodgkin, 2001).

C. elegans имеет все основные системы органов (пищеварительную, нервную, репродуктивную и т. д., хотя у него нет скелета) и проявляет фенотип старения перед смертью. Нейробиологи отметили такую особенность нервной системы, как миниатюрность (всего 302 нейрона), и был идентифицирован каждый из 7600 ее синапсов (нейронных связей) (White et al., 1986; Seifert et al., 2006). *C. elegans* особенно дружелюбен к молекулярным биологам. ДНК, инъецированная в его клетки, легко включается в их ядра, и *C. elegans* может захватывать двухцепочечную РНК из культуральной среды. Наконец, благодаря универсальности методов редактирования генома, таких как система CRISPR/Cas9 (см. гл. 3), исследователи в полной мере воспользовались созданием направленных нокаутных и инсерционных мутантов *C. elegans* (Dickinson and Goldstein, 2016).

Дробление и формирование осей у *C. elegans*

Оплодотворение у *C. elegans* не типичная история встречи сперматозоида и яйцеклетки. Большинство особей *C. elegans* гермафродиты, производящие как сперму, так и яйцеклетки, и оплодотворение происходит в пределах одной взрослой особи. Яйцо оплодотворяется, проходя через сперматеку — орган взрослого червя, содержащий зрелую сперму

(рис. 8.16А, Б). Сперматозоиды нематод не имеют типичную длиннохвостую обтекаемую форму. Они представляют собой маленькие круглые безжгутиковые клетки, которые медленно перемещаются путем амебоидного движения. В яйцеклетке после оплодотворения (слияния сперматозоида с ее мембраной) начинается быстрый синтез хитина (белка, составляющего кутикулу), что предотвращает полиспермию (Johnston et al., 2010). Оплодотворенная яйцеклетка приступает к дроблению и выходит через вульву.



С разрешения: D. G. Morton и K. Kemphues

Рис. 8.15. Развитие нематоды *Caenorhabditis elegans* происходит быстро и приводит к взрослой особи ровно с 959 соматическими клетками. Генеалогия индивидуальных клеток была прослежена в ходе развития этого животного. AB, E, MS, C и D являются клетками-основательницами. **А.** Микрофотографии дробящегося эмбриона в дифференциально-интерференционном контрасте. Клетки AB (слева) и P₁ (справа) появляются в результате первого асимметричного деления и приводят к разным линиям клеток (1). Четырехклеточный эмбрион состоит из клеток ABa, ABp, P₂ и EMS (2). Гастрюляция инициируется движением клеток-потомков бластомера E внутрь эмбриона (3). **Б.** Генеалогия и номенклатура клеток эмбриона *C. elegans*. Половая линия локализована в задней части самой задней (P) клетки. Первые три деления производят линии AB, C, MS и E. Число полученных клеток (в скобках) составляет 558 клеток и относится к недавно вылупившейся личинке. Часть из них продолжает делиться, чтобы произвести 959 соматических клеток взрослого червя. (Рис. Б из: M. Pines, 1992. From Egg to Adult: What Worms, Flies, and Other Creatures Can Teach Us about the Switches That Control Human Development — A Report from the Howard Hughes Medical Institute. Howard Hughes Medical Institute: Bethesda, MD, по данным: J. E. Sulston and H. R. Horvitz, 1977. *Dev Biol* 56: 110–156 and J. E. Sulston et al. 1983. *Dev Biol* 100: 64–119.)



Загадки развития

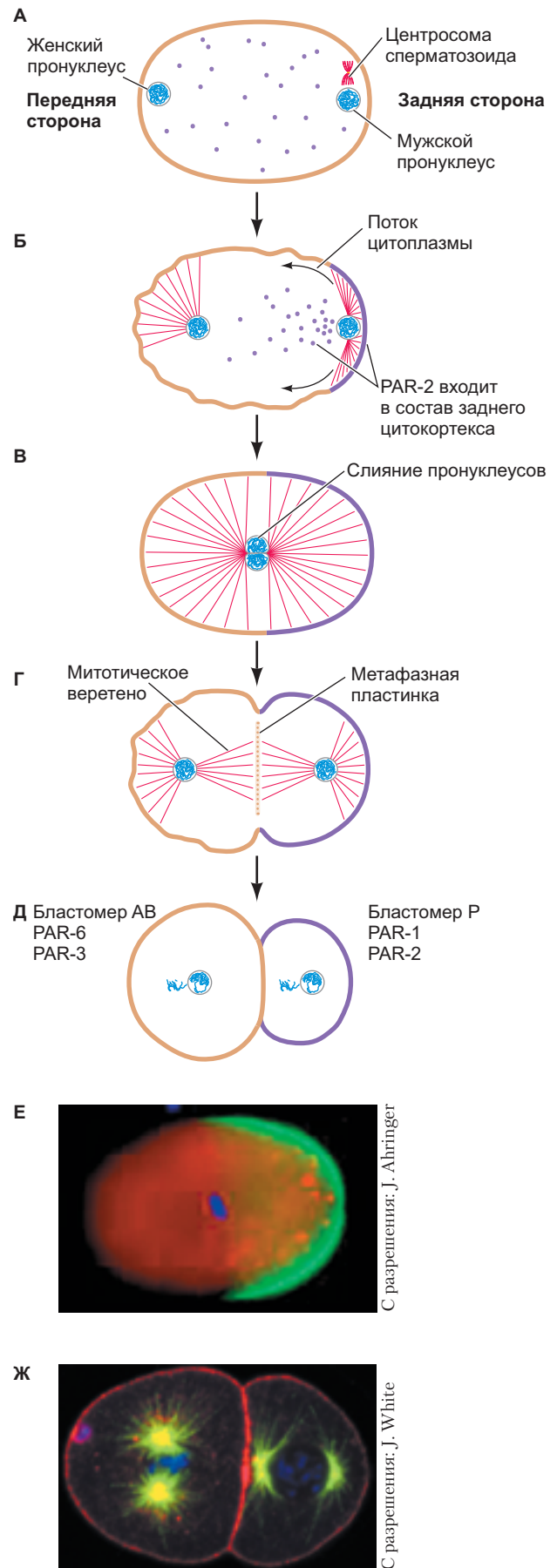
У людей есть триллионы клеток, регионализированный мозг и многосложные конечности. Нематода же имеет всего 959 клеток и может поместиться под ногтем. Однако у людей и *C. elegans* примерно одинаковое количество генов. В связи с этим у Джонатана Ходжкина, куратора геномной карты *C. elegans*, возник вопрос: «Что червь собирается делать с 20 000 генов?» Есть предложения?

«клетки-внучки» смещаются вперед по мере образования, при этом клетки-внучки AB (ABal и ABpl) находятся слева, а две другие (ABag и ABpr) — справа (см. рис. 8.16B).

Формирование передне-задней оси

Решение о том, какой конец яйцеклетки станет передним, а какой — задним, по-видимому, зависит от положения мужского пронуклеуса после оплодотворения (рис. 8.17). Когда ядро сперматозоида вместе с centrosомой входит в цитоплазму ооцита, ооцит еще не имеет полярности. Изменение места входа сперматозоида изменяет ориентацию передне-задней оси. Это указывает на то, что сперматозоид обеспечивает спецификацию передне-задней оси зиготы (Goldstein and Hird, 1996). Тем не менее компоненты ооцита тоже играют роль в этом процессе. Ооцит имеет специфичное распределение **PAR-белков** в цитоплазме (Motegi and Seydoux, 2013),

Рис. 8.17. PAR-белки и установление полярности. **А.** Когда сперматозоид входит в яйцеклетку, ядро ооцита подвергается мейозу (слева). Кортикальная цитоплазма (показана оранжевым) содержит PAR-3, PAR-6 и PKC-3, а внутренняя цитоплазма содержит PAR-2 и PAR-1 (фиолетовые точки). **Б, В.** Микротрубочки, организованные centrosомой сперматозоида, инициируют сокращение актинового цитоскелета к будущей передней стороне эмбриона. Они тоже защищают белок PAR-2 от фосфорилирования, позволяя ему проникать в кортекс вместе со своим связывающим партнером PAR-1. PAR-1 фосфорилирует PAR-3, в результате чего PAR-3 и его связывающие партнеры PAR-6 и PKC-3 покидают кортекс. **Г.** Заднюю часть клетки определяют PAR-2 и PAR-1, а переднюю — PAR-6 и PAR-3. Метафазная пластинка асимметрична, поскольку микротрубочки митотического веретена находятся ближе к заднему полюсу. **Д.** Метафазная пластинка разделяет зиготу на две клетки, одна из которых имеет передние PAR, а другая — задние. **Е.** Делящаяся зигота *C. elegans*: белок PAR-2 окрашен в зеленый цвет; ДНК показана синим. **Ж.** При втором делении клетки AB и P₁ делятся перпендикулярно (под углом 90° относительно друг друга). (Рис. А–Д по данным: R. Bastock and D. St. Johnston, 2011. *Dev Cell* 21: 981–982.)



а мутации в генах *par* приводят к нарушениям способности асимметрично распределять цитоплазматические детерминанты. PAR-3 и PAR-6, взаимодействуя с протеинкиназой PKC-3, равномерно распределяются в кортикальной цитоплазме. PKC-3 фосфорилирует PAR-1 и PAR-2 и тем самым ограничивает их локализацию внутренней цитоплазмой (рис. 8.17А). После оплодотворения centrosoma сперматозоида организует микротрубочки, приводя их в контакт с кортикальной цитоплазмой ооцита, что инициирует цитоплазматические движения, которые толкают мужской пронуклеус к ближайшему концу продолговатого ооцита. Этот конец становится задним полюсом (Goldstein and Hird, 1996). Микротрубочки, организованные centrosomой сперматозоида, локально защищают PAR-2 от фосфорилирования, тем самым позволяя PAR-2 (и связанного с ним партнера PAR-1) проникать в кортекс, ближайший к centrosome. Как только PAR-1 попадает в кортикальную цитоплазму, он фосфорилирует PAR-3, в результате чего PAR-3 (и связанный с ним партнер PKC-3) покидают кору. В то же время микротрубочки, организованные centrosomой сперматозоида, индуцируют сокращение актомиозинового цитоскелета в переднем направлении, таким образом очищая заднюю часть одноклеточного эмбриона от PAR-3, PAR-6 и PKC-3. Во время первого деления дробления метафазная пластинка начинает формироваться в центре, а затем перемещается назад, и оплодотворенная яйцеклетка делится на две клетки, одна из которых имеет передние PAR (PAR-6 и PAR-3), а другая — задние PAR (PAR-2 и PAR-1) (рис. 8.17Г–Ж; Goehring et al., 2011; Motegi et al., 2011; Rose and Gönczy, 2014).

Формирование дорсально-вентральной и право-левой осей

Дорсально-вентральная ось *C. elegans* устанавливается при делении клетки АВ. Когда клетка делится, она становится длиннее, чем ширина яйца. Происходящее при этом сжатие заставляет дочерние клетки скользить друг относительно друга, одна становится передней, а другая — задней (отсюда и их соответствующие названия, АВ_а и АВ_р; рис. 8.16В). Сжатие к тому же заставляет клетку АВ_р занимать положение над клеткой EMS, появившейся в результате деления бластомера Р₁. Таким образом, клетка АВ_р указывает на будущую дорсальную сторону эмбриона, а клетка EMS — предшественник мышечных и кишечных клеток — маркирует его будущую вентральную сторону.

Лево-правая ось устанавливается на 12-клеточной стадии, когда бластомер MS (от деления клетки EMS) связывается с половиной «внучек» клетки АВ_а, отделяя правую сторону тела от левой (Evans et al., 1994). Эта асимметричная передача сигналов создает основу для нескольких других индуктивных событий, которые отличают правую сторону личинки

от левой (Hutter and Schnabel, 1995). Действительно, можно отследить, что даже различия в нейрональном развитии левой и правой сторон мозга *C. elegans* являются следствием единственного изменения на 12-клеточной стадии (Poole and Hobert, 2006). Хотя лево-правая асимметрия хорошо видна на этом этапе, первые ее признаки, вероятно, появляются на стадии зиготы. Непосредственно перед первым делением дробления зародыш поворачивается внутри желточной оболочки на 120°. Вращение происходит всегда в одном и том же направлении относительно уже установленной передне-задней оси, что подтверждает наличие у эмбриона хиральности или зеркальной асимметрии. Если ингибировать белки цитоскелета или PAR-белки, направление вращения и последующая хиральность становятся случайными (Wood and Schonegg, 2005; Pohl, 2011).

Контроль идентичности бластомеров

C. elegans демонстрирует признаки как обусловленной окружением, так и автономной спецификации клеток. Оба механизма можно выявить путем экспериментального разделения первых двух бластомеров (Priess and Thomson, 1987). Будучи отделенной от АВ, клетка Р₁ развивается автономно и генерирует все клетки, которые должна производить в норме, в результате формируя заднюю половину зародыша. Однако отделенная клетка АВ производит лишь небольшую часть типов клеток, которые делает в обычных условиях. Например, бластомер АВ_а, полученный из изолированной клетки АВ, не способен сформировать передние мышцы глотки, которые он формирует у неповрежденного эмбриона. Следовательно, спецификация АВ-бластомера является обусловленной, и, чтобы нормально развиваться, он должен взаимодействовать с потомками клетки Р₁.

АВТОНОМНАЯ СПЕЦИФИКАЦИЯ

Детерминация пути развития потомков Р₁, по-видимому, происходит автономно, поскольку определена внутренними цитоплазматическими факторами, а не взаимодействием с соседними клетками (Maduro, 2006). Белки SKN-1, PAL-1 и PIE-1 — факторы транскрипции, которые определяют идентичность клеток, полученных из четырех соматических клеток-основательниц (MS, E, C и D), являющихся потомками Р₁.

ОБУСЛОВЛЕННАЯ СПЕЦИФИКАЦИЯ

Как упоминалось ранее, эмбрион *C. elegans* использует как автономный, так и зависимый от окружения и (обусловленный) режимы спецификации. Обусловленная спецификация происходит в развитии

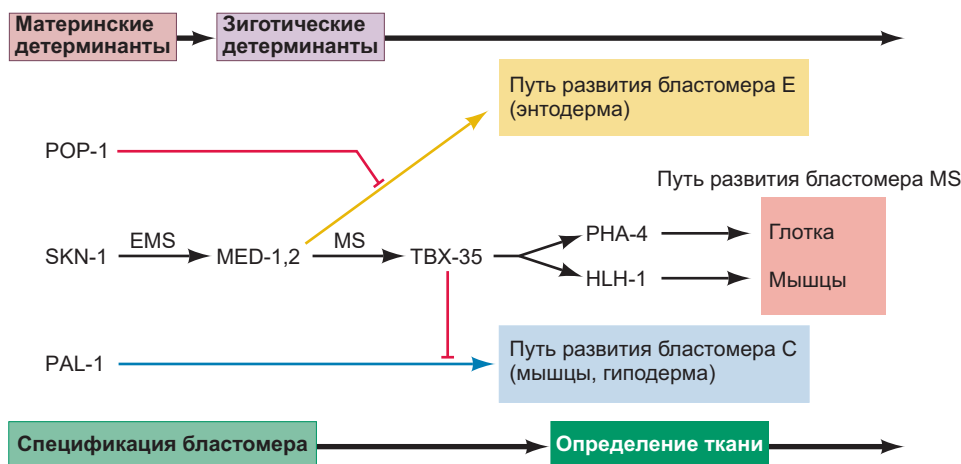


Рис. 8.18. Модель спецификации бластомера MS. Материнский SKN-1 активирует Gata-подобные факторы транскрипции MED-1 и MED-2 в клетке EMS. Сигнал POP-1 предотвращает активацию этими белками энтодермальных факторов транскрипции (например, END-1) и вместо этого активирует ген *tbx-35*. Фактор транскрипции TBX-35 активирует мезодермальные гены в клетке MS, включая *pha-4* в клетках глотки и *hlh-1* (который кодирует миогенный фактор транскрипции) в мышцах. TBX-35 также ингибирует экспрессию гена *pal-1*, тем самым предотвращая приобретение клетками MS статуса C-бластомеров. (По данным: G. Broitman-Maduro et al., 2006. *Development* 133: 3097–3106.)

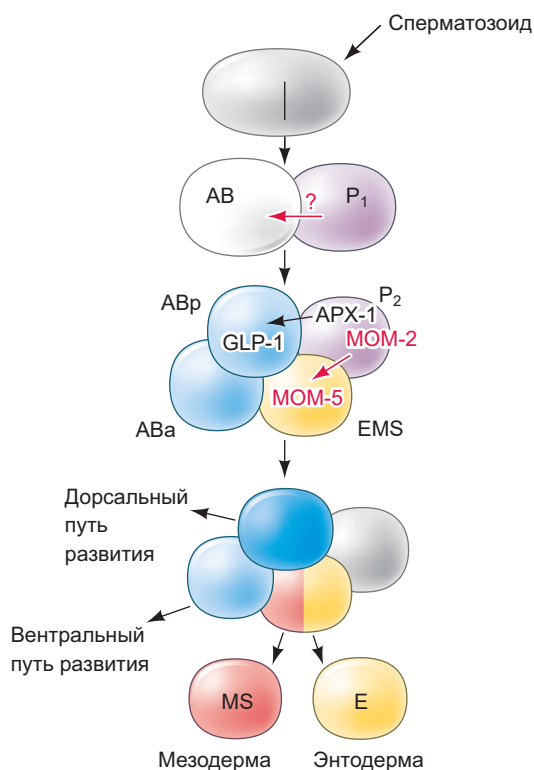


Рис. 8.19. Межклеточная сигнализация у четырехклеточного эмбриона *C. elegans*. Клетка P₂ генерирует два сигнала: 1) юстакринный белок APX-1 (гомолог Delta), который связывается с GLP-1 (Notch) на клетке ABp; 2) паракринный белок MOM-2 (Wnt), который связывается с белком MOM-5 (Frizzled) на клетке EMS. (По данным: M. Han, 1998. *Cell* 90: 581–584.)

энтодермы. На стадии четырех клеток бластомеру EMS необходим сигнал от соседнего бластомера и сестринской клетки P₂. Обычно EMS делится на клетку MS, образующую мышечную мезодерму, и клетку E, образующую энтодерму кишечника. Если на ранней стадии четырех клеток удалить бластомер P₂, то EMS разделится на две клетки MS, и энтодерма не сформируется. Такое индукционное взаимодействие подтверждают эксперименты, в которых P₂ перемещали на другую сторону от бластомера EMS. Перемещение приводит к тому, что две половины EMS (E и MS) меняются статусами. Эти результаты вместе с другими показывают, что именно взаимодействие с бластомером P₂ определяет различия в развитии клеток E и MS (Goldstein, 1993; 1995).

Спецификация бластомера MS начинается с того, что материнский фактор SKN-1 активирует гены, кодирующие факторы транскрипции, в том числе MED-1 и MED-2. Сигнал POP-1 (гомолог белка TCF, связывающего β -катенин с ДНК) в бластомере MS блокирует путь к энтодермальному развитию, что приводит к тому, что MED-1 и MED-2 активируют ген *tbx-35* (рис. 8.18; Broitman-Maduro et al., 2006; Maduro, 2009). Известно, что белки TBX активны в образовании мезодермы во всем животном мире; TBX-35 действует как активатор мезодермальных генов, таких как *pha-4* в глотке и *hlh-1* (гомолог *myoD*) в мышцах *C. elegans*.

Клетка P₂ генерирует сигнал, который взаимодействует с EMS и индуцирует ее дочернюю клетку стать E-бластомером. Индукция передается через сигнальный каскад Wnt (рис. 8.19; Rocheleau et al.,

1997; Thorpe et al., 1997; Walston et al., 2004). Клетка P₂ продуцирует белок MOM-2, гомолог Wnt. Сигнал MOM-2 передается в клетку EMS с помощью белка MOM-5, гомологичного Frizzled, рецептору Wnt. Когда EMS делится, данный сигнальный каскад ограничивается задней дочерней клеткой и подавляет в ней экспрессию гена *pop-1*. Это заставляет заднюю дочернюю клетку становиться Е-бластомером.

Экспрессия гена *pop-1* в передней дочерней клетке продолжается и приводит к тому, что она становится MS-бластомером. У эмбрионов с дефектным геном *pop-1* обе клетки-потомки EMS становятся Е-бластомерами (Lin et al., 1995; Park et al., 2004). Таким образом, Wnt-сигнальный путь специфицирует развитие клеток в соответствии с передне-задней осью. Как мы увидим далее, Wnt-сигнализация, по-видимому, индуцирует спецификацию передне-задней оси по всему животному царству.

Гастрюляция 66 клеток у *C. elegans*

Гастрюляция у *C. elegans* начинается чрезвычайно рано — сразу после образования клетки P₄ на стадии 26-клеточного эмбриона (рис. 8.20А; Skiba and Schierenberg, 1992). В это время две клетки — потомки Е (Еа и Ер) с брюшной стороны погружаются в центр эмбриона. Происходит интернализация путем **апикального сокращения** — распространенного механизма изменения формы клетки, во время которого актино-миозиновое сокращение на апикальной стороне клетки уменьшает площадь ее апикальной поверхности относительно базальной.

Как видно во время гастрюляционных событий, происходящих при развитии эмбрионов *Drosophila*, *Xenopus*, *Danio*, курицы и мыши, эта форма поляризации клеток создает начальную область инвагинации внутрь зародыша. Оказавшись внутри, Е-бластомер делится, образуя кишку, состоящую из 20 клеток. Перед движением Еа и Ер ненадолго формируется очень маленький бластоцель. Кроме потомков Е-бластомера интернализуется еще 64 клетки, путь развития и генеалогия каждой из которых прослежены и картированы (рис. 8.20Б).

Следующими являются некоторые клетки из нейральной линии развития потомков АВ. Далее интернализуется предшественник половых клеток P₄, который перемещается в положение под зачатком кишки. Клетки мезодермы перемещаются следующим образом: сначала интернализируются потомки клетки MS, а за ними следуют предшественники мышц С и D. Эти клетки располагаются слева и справа от кишки (Schierenberg, 1997).

Наконец, примерно через 6 ч после оплодотворения внутрь дополнительно поступают клетки — потомки АВ, вносящие вклад в формирование глотки. В то же время на последнем этапе эпителии клетки гипобласта (предшественники гиподермальных клеток) двигаются в вентральном направлении и закрывают бластопор на вентральной стороне. В итоге две стороны гиподермы скрепляются Е-кадгериновыми контактами на кончиках ведущих клеток, которые встречаются вдоль вентральной средней линии зародыша (Raich et al., 1999; Harrell and Goldstein, 2011).

В течение следующих 6 ч клетки продолжают перемещаться и формируют органы, а шарообразный эмбрион вытягивается и превращается в червя с 556 соматическими клетками и двумя стволовыми клетками половой линии (рис. 8.20В; Priess and Hirsh, 1987; Schierenberg, 1997; Harrell and Goldstein, 2011).

В развитии имеют место другие механизмы; так, еще 115 клеток подвергаются апоптозу (запрограммированной гибели). После четырех линек червь становится взрослым половозрелым гермафродитом, содержащим ровно 959 соматических клеток, а также множество сперматозоидов и яйцеклеток.

Даже в таком «простом» организме, как *C. elegans*, с маленьким геномом и небольшим числом типов клеток правая сторона тела устроена иначе, чем левая. Выявление генов, упомянутых выше, лишь от правая точка в изучении сложных взаимодействий в развитии организма.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Слияние клеток в эмбрионе *C. elegans*

Одна из особенностей, которые отличают развитие *C. elegans* от большинства других хорошо изученных организмов, — распространенное слияние клеток. Во время гастрюляции *C. elegans* около трети всех клеток сливаются вместе, образуя синцитиальные клетки, содержащие много ядер. 186 клеток, включающие гиподерму (кожу) нематоды, сливаются в восемь синцитиальных клеток, кроме того, слияние наблюдается в вульве, матке и глотке.

Функциональную роль этого процесса можно выяснить, изучая последствия мутаций, препятствующих формированию синцитиев (Shemer and Podbilewicz, 2000; 2003). По всей видимости, слияние предотвращает миграцию отдельных клеток за пределы их нормальных границ. В области вульвы (см. гл. 4) слияние клеток гиподермы препятствует принятию ими вульвального статуса и возникновению эктопической (и нефункциональной) вульвы.

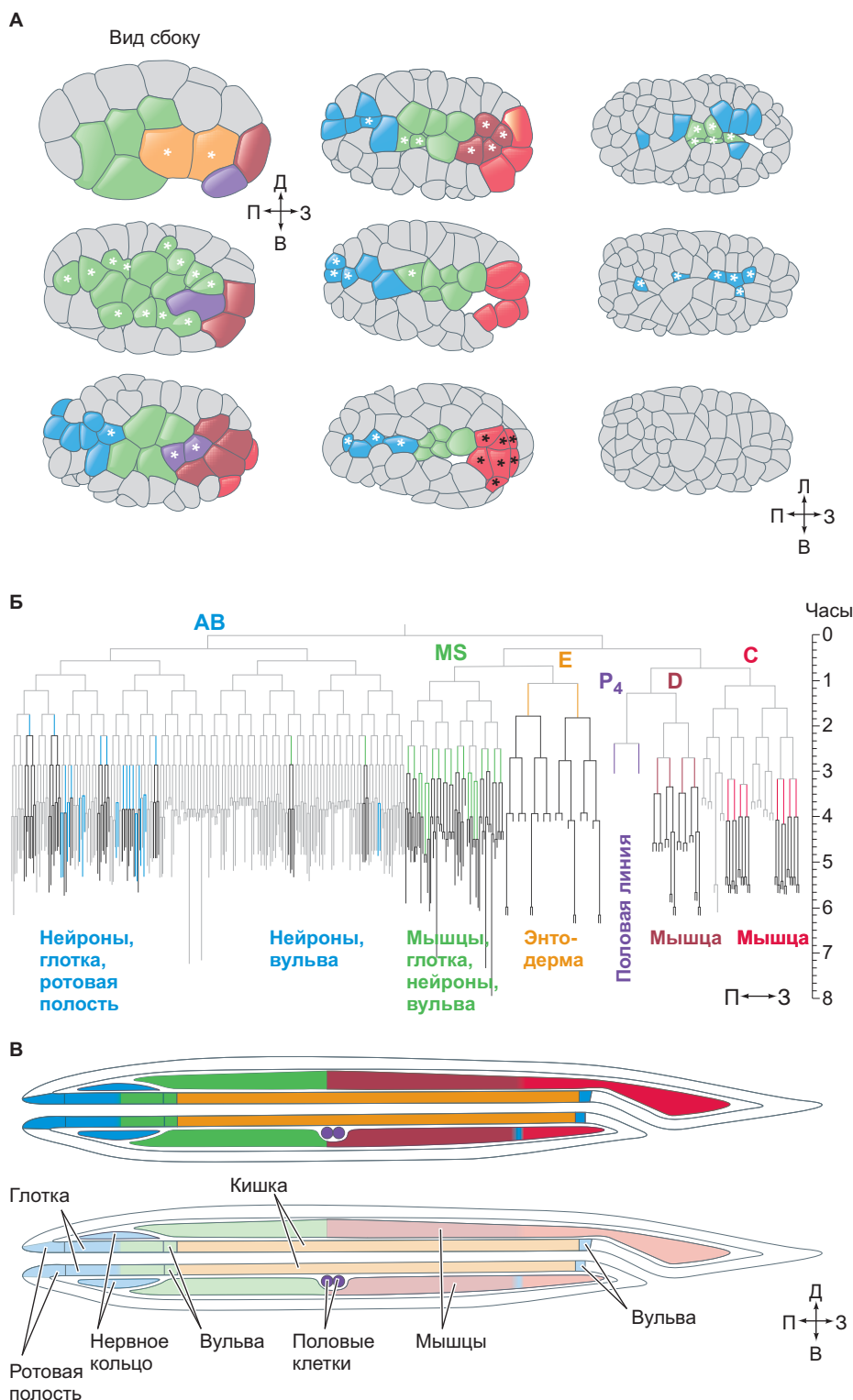


Рис. 8.20. Гастрюляция у *C. elegans*. **А.** Временные ряды 66 клеток зародыша в ходе гастрюляции (потомки бластомеров Е, MS, P₄, D, а также бластомеров АВ и С, которые гастрюлируют, обозначены цветом, ключ см. на рис. Б). Верхняя левая схема — вид сбоку; остальные — вид с вентральной стороны. Звездочки обозначают клетки, которые интернализуются. **Б.** Карта клеточного развития для всех 66 гастрюлирующих клеток *C. elegans*. Каждая горизонтальная линия представляет деление клетки; длины вертикальных линий пропорциональны времени между клеточными делениями (см. ось справа). **В.** Конечные положения клеточных линий у личинки червя. (Рис. А–Б по данным: J. R. Harrell and B. Goldstein, 2011. *Dev Biol* 350: 1–12; рис. В по данным: J. E. Sulston et al., 1983. *Dev Biol* 100: 64–119.)



О фотографии в начале главы

В 1923 г. Альфред Стуртевант идентифицировал левозакрученность раковины у улиток как одну из первых известных мутаций развития. Он смог связать генетику улиток *Radix* с направлением закрученности их раковины, установив, что левозакрученный (синистральный) фенотип обусловлен материнским влиянием. Его работы наглядно продемонстрировали значительную роль генов в развитии. В 2016 г., возможно, была идентифицирована генетическая основа закрученности улиток и намечен путь, определяющий лево-правую асимметрию (Davison et al., 2016; Kuroda et al., 2016). Для сравнения, исследование высокостереотипного спирального рисунка частей цветка у растений перспективно для понимания того, как комбинация морфогенетических и механических механизмов может стать основой для саморегулирующегося процесса формирования паттерна. Какие новые выводы еще предстоит сделать путем дальнейших прямых сравнений между растениями и животными, такими как эти ромашка и улитка?

8

Коротко

Улитки, цветы и нематоды

1. Оси тела устанавливаются по-разному: у одних видов — при оплодотворении с помощью распределения детерминант в цитоплазме яйца, у других — с помощью клеточных взаимодействий при дальнейшем развитии.
2. Для улиток и нематод характерно голобластическое дробление. У улиток оно спиральное, у нематод — ротационное.
3. У улиток и *C. elegans* гастрюляция начинается, когда эмбрион состоит из относительно небольшого числа клеток.
4. Спиральное дробление у улиток завершается формированием стерробластулы (бластулы без бластоцеля). Направление спиральности дробления регулирует фактор, который синтезирует и поставляет в ооцит мать.
5. Спиральный паттерн филлотаксиса в соцветии *Arabidopsis thaliana* достигается с помощью саморегулирующегося механизма, включающего взаимодействие ауксиновой сигнализации и механического напряжения в меристеме.
6. Полярная лопасть некоторых моллюсков содержит детерминанты, специфицирующие мезодермальную и энтодермальную линии развития клеток. Детерминанты попадают в D-бластомер.
7. Почвенная нематода *Caenorhabditis elegans* была выбрана в качестве модельного организма, поскольку имеет небольшое число клеток, небольшой геном, проста в уходе и легко размножается, имеет короткий срок жизни, может претерпевать генетические манипуляции и имеет прозрачную кутикулу, через которую нетрудно проследить движения клеток.
8. При первых делениях зиготы *C. elegans* одна дочерняя клетка становится клеткой-основательницей (продуцирует дифференцированные клетки), а другая — стволовой клеткой (продуцирует другие клетки-основательницы и клетки половой линии).
9. Детерминацию судьбы бластомеров у *C. elegans* регулирует как автономная, так и обусловленная спецификация.

Генетика спецификации осей у *Drosophila*

9

Четыре крыла!
Вторая пара появилась дополнительно
или на месте чего-то еще?



С разрешения: Nipam Patel

Во многом благодаря исследованиям, инициируемым в течение первых двух десятилетий XX в. лабораторией Томаса Ханта Моргана, мы знаем о генетике *Drosophila melanogaster* больше, чем о любом другом многоклеточном организме (рис. 9.1). Причины кроются как в самих мушках, так и в людях, которые их впервые изучили. *Drosophila* легко размножается, вынослива, плодовита и приспособлена к различным условиям. Более того, во многих личиночных клетках ДНК реплицируется несколько раз без деления. Это приводит к тому, что сотни нитей ДНК прилегают друг к другу и образуют политенные (в пер. с греч. — много нитей) хромосомы (рис. 9.2). Неиспользуемая ДНК более конденсирована и окрашивается темнее, чем участки активной цепи. Эти полосы использовали для указания физического расположения генов на хромосомах. Лаборатория Моргана создала базу мутантных линий (см. рис. 9.1), а также обменную сеть, благодаря которой любая исследовательская группа могла получить их.

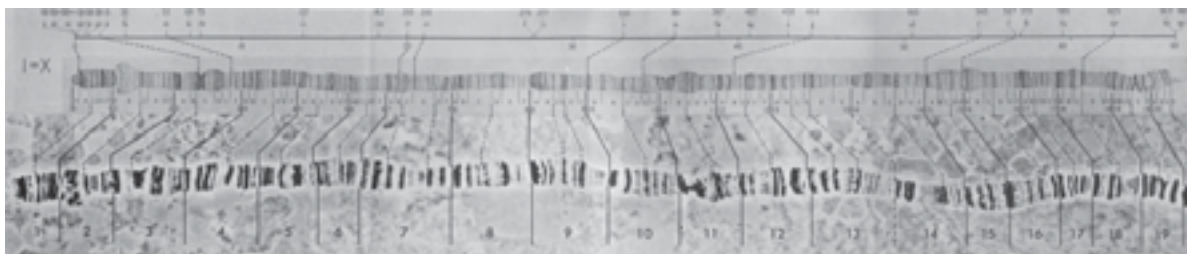
Джек Шульц (первоначально в лаборатории Моргана) и другие пытались соотнести растущий объем данных о генетике *Drosophila* с ее развитием. Но мушки оказались не простыми организмами для изучения эмбриологии. Сложные и неподатливые их эмбрионы не были ни достаточно большими, чтобы проводить экспериментальные манипуляции, ни достаточно прозрачными для наблюдения под микроскопом. И только когда методы молекулярной биологии позволили исследователям идентифицировать гены и манипулировать ими и РНК насекомого, генетику удалось связать с развитием, что стало революцией в области биологии. Эта революция продолжается до сих пор, в значительной степени благодаря доступности информации о полной последовательности генома *Drosophila* и нашему умению успешно создавать трансгенных мушек



© Martin Shields/Alamy Stock Photos

Рис. 9.1. Лаборатория Т. Х. Моргана и разработка эффективной системы генетических моделей. Многие исследователи лаборатории помогли сделать *Drosophila melanogaster* одной из выдающихся модельных систем для генетики и биологии развития. *Слева:* Лилиан Воан Морган в «мушиной комнате». Лилиан была замужем за Томасом и независимо работала над генетикой развития признаков, сцепленных с полом (Кеепан, 1983). *Справа:* фотография мушек дикого типа (левая, с красными глазами) и мутантной (правая, с белыми глазами). Ген *white* был одним из первых сцепленных с полом признаков, обнаруженных в лаборатории Моргана

А

Из: С. В. Bridges. 1938. *J Hered* 29: 11–13

Б

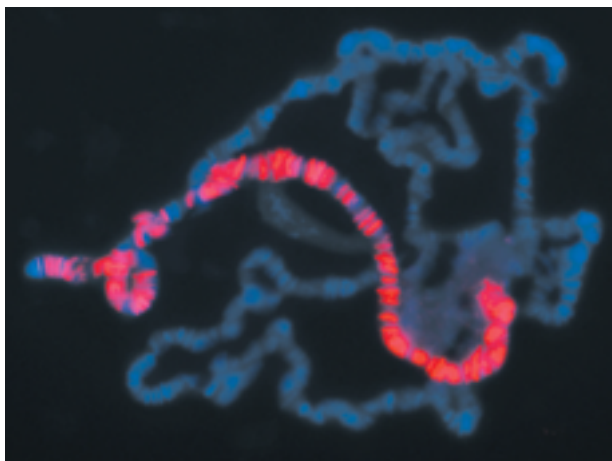
Фотография: А. А. Alekseyenko
и М. I. Kuroda

Рис. 9.2. Политенные хромосомы *Drosophila*. ДНК слюнных желез и других тканей личинки реплицируется без расхождения. **А.** Фотография X-хромосомы *D. melanogaster*. Схема сверху была сделана студентом Моргана Кэлвином Бриджесом в 1935 г. **Б.** Хромосомы из клеток слюнных желез самца *D. melanogaster* третьего возраста. Каждая политенная хромосома имеет 1024 нити ДНК (синее окрашивание). Антитела против фактора транскрипции MSL (красное окрашивание) связываются только с генами на X-хромосоме. MSL ускоряет экспрессию генов в единственной X-хромосоме самца, так что она количественно может соответствовать экспрессии генов у самок с двумя X-хромосомами

(Pfeiffer et al., 2010; del Valle Rodríguez et al., 2011). Теперь исследователи могут выявлять взаимодействия развития, происходящие в очень маленьких областях эмбриона, идентифицировать энхансеры и их факторы транскрипции, а также математически моделировать взаимодействия с необычайной степенью точности (Henggenius et al., 2014; Markow, 2015; Kaufman, 2017).

Раннее развитие *Drosophila*

Мы уже обсуждали спецификацию ранних эмбриональных клеток с помощью цитоплазматических детерминант, хранящихся в ооците. Во время дробления образуются клеточные мембраны, ограничивающие области цитоплазмы, которые входят в состав бластомеров и несут морфогенетические детерминанты, направляющие дифференциальную экспрессию генов в образующихся клетках (рис. 9.3). Но в раз-

витии *Drosophila* клеточные мембраны не разделяют ядро до тринадцатого деления. До этого времени все делящиеся ядра имеют общую цитоплазму и материал может диффундировать по всему эмбриону. Происходит **синцитиальная спецификация**, т. е. различные типы клеток вдоль передне-задней и дорсально-вентральной осей специфицируются в результате взаимодействий компонентов в *составе* одной многоядерной клетки. Если у нематод и оболочников оси определяются местом вхождения сперматозоида, то у *Drosophila* формирование передне-задней и дорсально-вентральной осей обусловлено взаимодействиями яйцеклетки и окружающих ее фолликулярных клеток еще до оплодотворения.

Оплодотворение

При оплодотворении *Drosophila* происходит замечательная серия событий, которые сильно отличаются от описанных ранее процессов оплодотворения.

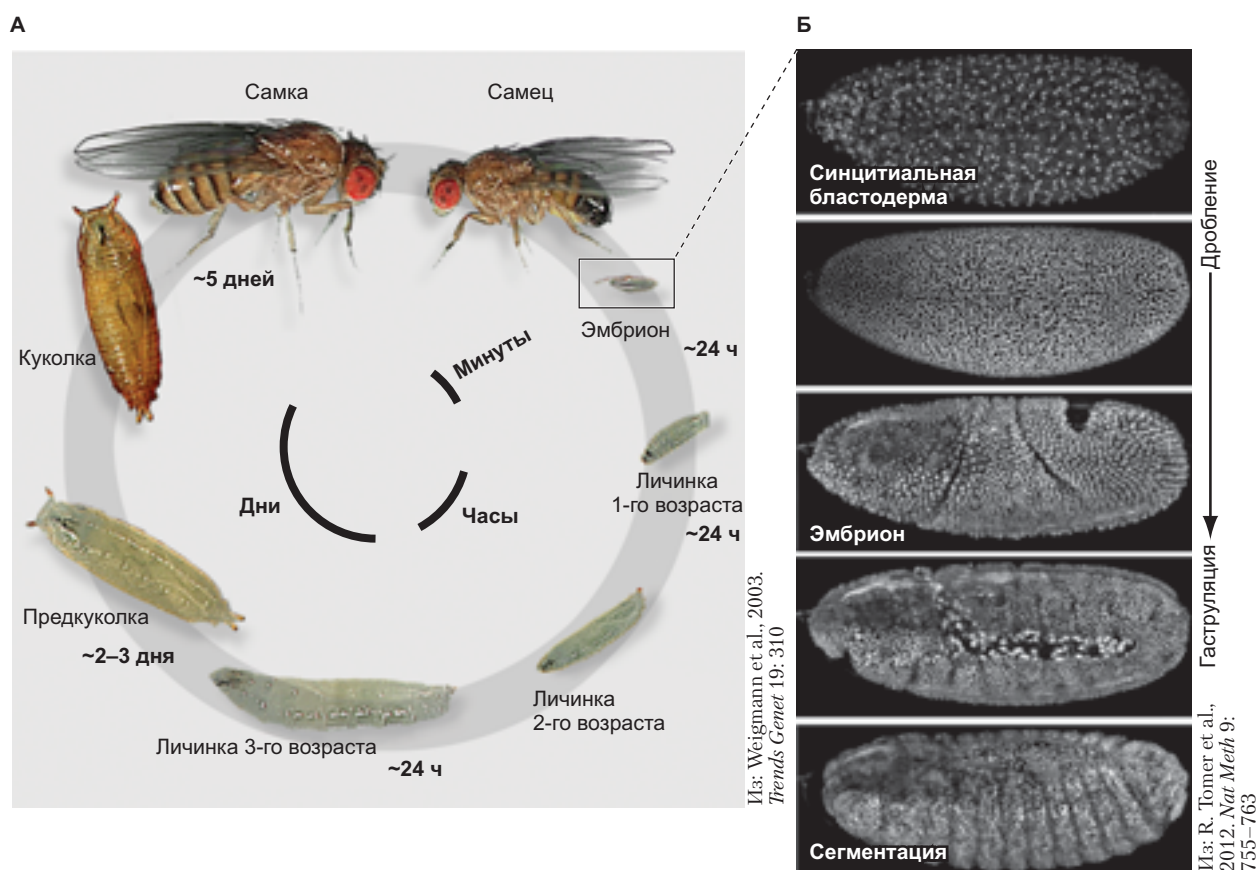


Рис. 9.3. Жизненный цикл *Drosophila melanogaster*. **А.** После оплодотворения эмбриогенез начинается с деления ядер (дробления) и последующей их целлюляризации, за которой следуют клеточные и тканевые движения гастрюляции и органогенезов. Эмбрион вылупляется как личинка 1-го возраста, которая растет и через две линьки становится личинкой 3-го возраста. Личинка 3-го возраста становится куколкой, которая превращается во взрослую муху. **Б.** Передне-задняя разметка эмбриональных сегментов визуализирована с помощью флуоресцентно меченого гистона в эмбрионе живой мухи и современной light-sheet-микроскопии

- Сперматозоид попадает в яйцеклетку, которая уже активирована. Активация яйцеклетки у *Drosophila* осуществляется при овуляции, за несколько минут до начала оплодотворения. По мере того как ооцит *Drosophila* пролезает через узкое отверстие, открываются кальциевые каналы, пропускающие Ca^{2+} внутрь клетки. Вслед за этим без оплодотворения ядро ооцита возобновляет мейотическое деление, а цитоплазматические мРНК начинают транслироваться (Mahowald et al., 1983; Fitch and Wakimoto, 1998; Heifetz et al., 2001; Horner and Wolfner, 2008).

- Существует одно-единственное место, где сперматозоид может попасть в яйцеклетку. Это место называют **микропиле** — туннель в хорионе (оболочке яйца), расположенный в будущей дорсальной передней области эмбриона. Сперматозоиды могут проходить через микропиле только по одному, что, вероятно, предотвращает возникновение полиспермии у *Drosophila*. В яйце нет кортикальных гранул, которые блокировали бы полиспермию, хотя изменение кортекса яйцеклетки все же происходит.

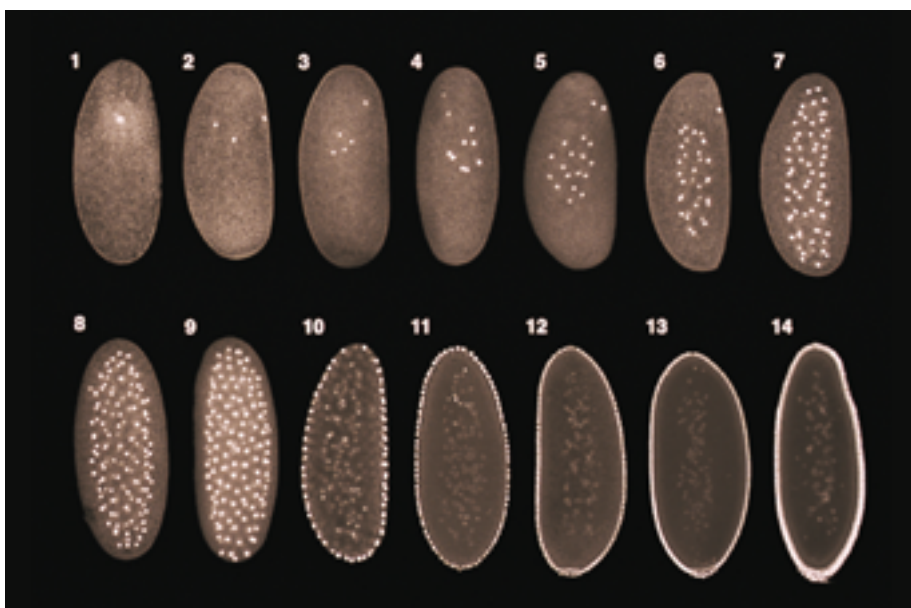
- К моменту вхождения сперматозоида в яйцеклетку она уже начала специфицировать оси тела; таким образом, сперматозоид попадает в яйцеклетку, которая уже самоорганизована как зародыш.

- Мембраны сперматозоида и яйцеклетки не сливаются. Скорее, сперматозоид попадает в яйцеклетку без изменений. ДНК мужского и женского пронуклеусов реплицируются до их слияния, а после слияния пронуклеусов материнские и отцовские хромосомы остаются разделенными до конца первого митоза (Lorpin et al., 2015).

Дробление

Яйца большинства насекомых претерпевают **поверхностное дробление**, при котором центральное расположение большой массы желтка позволяет дробиться только краевой цитоплазме яйца (см. рис. 1.9). Одна из замечательных особенностей этого типа дробления заключается в том, что, до тех пор пока ядра не разделятся достаточное число раз, клетки не образуются. В яйце *Drosophila* кариокинез (деление ядер) происходит без цитокинеза (деления клеток), в результате чего образуется **синцитий**, единственная клетка с множеством ядер, находящихся в общей цитоплазме (рис. 9.4; см. также рис. 2.11). Ядро зиготы несколько раз делится в центральной части яйца; в результате серии из восьми ядерных делений, в среднем по 8 мин каждое, образуется 256 ядер (рис. 9.5А, Б). Такая высокая скорость деления достигается посредством повторяющихся раундов чередующихся S-фазы (синтез ДНК) и М-фазы (митоз) клеточного цикла в отсутствие промежуточных (G) фаз. Во время девятого цикла деления в среднем пять ядер достигают поверхности заднего полюса зародыша. Эти ядра окружаются клеточными мембранами и образуют **полярные клетки**, дающие начало гаметам взрослого насекомого. На десятом цикле другие ядра мигрируют в кортекс (периферию) яйца и продолжают делиться, хотя и с более низкой скоростью (рис. 9.5В, Г; Foe et al., 2000). На этих стадиях ядерных делений эмбрион называют **синцитиальной бластодермой**, поскольку он не имеет никаких клеточных мембран, кроме мембраны самой яйцеклетки.

Хотя ядра делятся в общей цитоплазме, сама цитоплазма далеко не однородна. Карр и Альбертс (1986)



С разрешения: D. Daily и W. Sullivan

Рис. 9.4. Лазерные конфокальные микрофотографии окрашенного хроматина, показывающие деления синцитиальных ядер и поверхностное дробление в серии эмбрионов *Drosophila*. Будущий передний конец расположен сверху; цифрами обозначены циклы делений ядер. Ранние деления ядер происходят центрально внутри синцития. Затем ядра и их цитоплазматические островки (энергиды) мигрируют на периферию клетки. Так формируется синцитиальная бластодерма. После 13-го цикла, в результате втягивания клеточных мембран между ядрами, образуется клеточная бластодерма. Полярные клетки (предшественники половых клеток) обособляются в задней части эмбриона

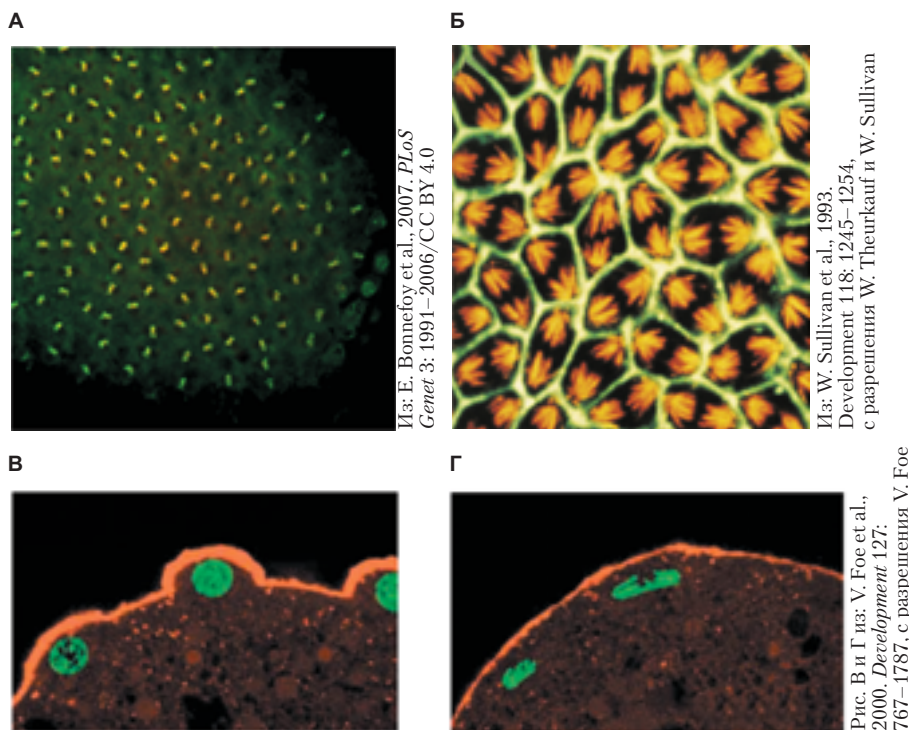


Рис. 9.5. Деление ядер и клеток у эмбрионов *Drosophila*. **А.** Деление ядер (но не клеток) в синцитиальном эмбрионе *Drosophila*, визуализированное с помощью красителя, окрашивающего ДНК. Можно увидеть первую область целлюляризации на заднем полюсе, где обособляются полярные клетки, которые в итоге станут половыми клетками (сперматозоидами или яйцеклетками). **Б.** Деление хромосом в кортексе синцитиальной бластодермы. Хотя клеточных границ нет, можно заметить, что актин (зеленое окрашивание) образует области, внутри которых делится каждое ядро. Микротрубочки митотического аппарата окрашены антителами к тубулину в красный цвет. **В, Г.** Поперечный срез части эмбриона *Drosophila* 10-го цикла делений с ядрами (зеленое окрашивание) в кортексе синцитиальной клетки, прилегающими к слою актиновых филаментов (красное окрашивание). **В.** Интерфазные ядра. **Г.** Ядра в анафазе, деление которых происходит параллельно кортексу, что позволяет им оставаться на периферии клетки

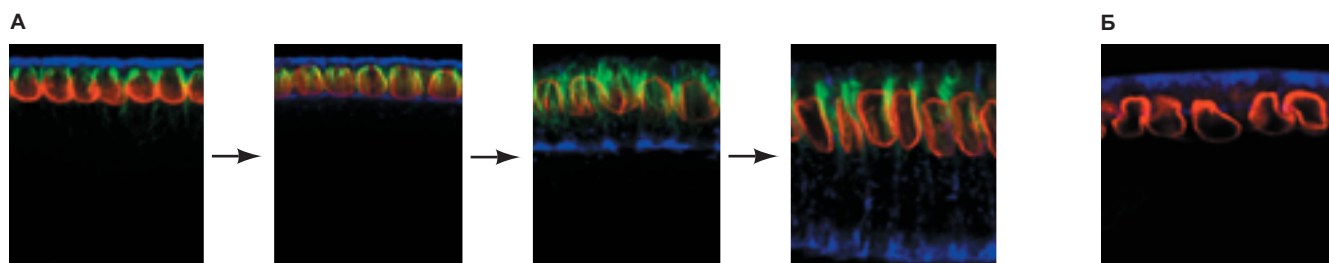
показали, что каждое ядро в синцитиальной бластодерме окружено его собственной небольшой территорией с цитоскелетными белками (см. рис. 2.12). Когда ядра достигают периферии яйца в течение десятого цикла дробления, каждое ядро окружают микротрубочки и актиновые филаменты. Ядра и связанные с ними цитоплазматические островки называют **энергидами**. После 13-го цикла деления клеточная мембрана, покрывающая яйцеклетку, образует складки между ядрами и постепенно разделяет энергиды на отдельные клетки. В результате этого процесса образуется **клеточная бластодерма**, в которой все клетки расположены одним слоем вокруг желточной сердцевины яйца (Turner and Mahowald, 1977; Foe and Alberts, 1983; Mavrikakis et al., 2009).

Как и при любом формировании клеток, образование клеточной бластодермы происходит при тонком взаимодействии микротрубочек и актиновых филаментов (рис. 9.6). Движение мембран, удлинение ядер и полимеризацию актина, по-видимому, координируют микротрубочки (Riparbelli et al., 2007). Для первой фазы целлюляризации бластодермы характер-

но вворачивание клеточных мембран между ядрами с образованием борозд. Этот процесс может быть предсказуемо ингибирован веществами, которые блокируют микротрубочки. После того как борозды прошли уровень ядер, наступает вторая фаза целлюляризации. Скорость инвагинации увеличивается, и актин-мембранный комплекс начинает сокращаться в области будущего базального конца клетки (Foe et al., 1993; Schejter and Wieschaus, 1993; Mazumdar and Mazumdar, 2002). У *Drosophila* клеточная бластодерма состоит приблизительно из 6000 клеток и образуется в течение 3 ч после оплодотворения.

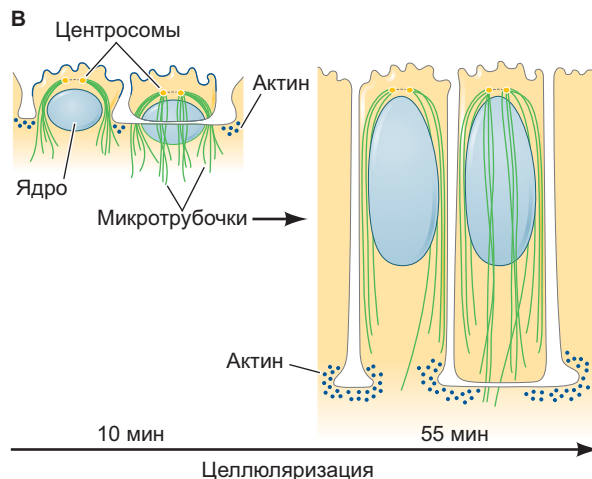
Переход на средней бластуле

После того как ядра достигают периферии, время, необходимое для завершения каждого из следующих четырех делений, постепенно увеличивается. В то время как циклы 1–10 составляют в среднем по 8 мин каждый, цикл 13 (последний цикл в синцитиальной бластодерме) занимает 25 мин. В цикле



Из: A. Brandt et al., 2006. *Curr Biol* 16: 543–552, с разрешения J. Grosshans и A. Brandt

Рис. 9.6. Формирование клеточной бластодермы у *Drosophila*. Изменение формы ядер и целлюляризацию координирует цитоскелет. **А.** Целлюризация и изменение формы ядер визуализированы окрашиванием микротрубочек (зеленый), актиновых филаментов (синий) и ядер (красный). Красное пятно в ядрах — белок Kugelkern, один из самых ранних белков, продуцируемых зиготическими ядрами, важный для их удлинения. **Б.** Этот эмбрион был обработан нокадазолом для разрушения микротрубочек. Ядра не удлиняются, и целлюляризации не происходит. **В.** Схематичное изображение образования клеток и удлинения ядер. (По данным: A. Brandt et al., 2006. *Curr Biol* 16: 543–552.)



14 эмбрион *Drosophila* образует клетки (т. е. после 13 делений), он является асинхронным. Одни клетки завершают этот цикл за 75 мин, другие — за 175 мин (Фое, 1989).

Именно в это время гены ядер становятся активными. До этого момента ранним развитием *Drosophila* управляют белки и мРНК, запасенные в яйце во время оогенеза. Это продукты *материнских* генов, а не генов ядер самого эмбриона. Такие гены, активные в матери и производящие продукты для раннего развития потомства, называют **генами материнского эффекта**, а мРНК в ооците часто называют **материнскими мРНК**. Транскрипция зиготических генов (т. е. активация собственных генов эмбриона) начинается около 11-го цикла и значительно усиливается в 14-м цикле. Этот период, когда происходят замедление деления ядер, целлюляризация и сопутствующее усиление транскрипции новой РНК, часто называют **переходом на средней бластуле** (Yuan et al., 2016). Именно на этом этапе материнские мРНК деградируют и контроль развития передается собственному геному зиготы (Brandt et al., 2006; De Renzis et al., 2007; Benoit et al., 2009; Laver et al., 2015). Такой **материнско-зиготический переход** можно наблюдать у эмбрионов многих позвоночных и беспозвоночных животных.

Гаструляция

Общий план тела *Drosophila* одинаков у эмбриона, личинки и взрослого насекомого: у каждого есть

отчетливый головной и хвостовой концы, между которыми повторяются сегментарные единицы. Три из сегментов формируют грудную клетку, еще восемь — брюшную полость. Каждый сегмент взрослой мушки имеет свои отличительные черты. Например, первый грудной сегмент имеет только ноги; второй грудной сегмент имеет ноги и крылья; третий грудной сегмент имеет ноги и жужжальца (органы балансировки полета).

Гаструляция начинается вскоре после средне-бластульного перехода. Первые гаструляционные движения у *Drosophila* разделяют презумптивную мезодерму, энтодерму и эктодерму. Проспективная мезодерма — около 1000 клеток, составляющих вентральную срединную линию эмбриона — складывается внутрь, образуя **вентральную бороздку** (рис. 9.7А). Бороздка отделяется от поверхности и становится вентральной трубкой внутри эмбриона. Проспективная энтодерма инвагинирует, образуя два кармана на переднем и заднем концах вентральной бороздки. Полярные клетки интернализируются вместе с энтодермой (рис. 9.7Б, В). В это время наружный слой ткани (ектодерма) образует головную бороздку.

Эктодермальные клетки на поверхности и мезодерма подвергаются конвергенции и растяжению, мигрируют к вентральной средней линии, образуя **зародышевую полосу** — совокупность клеток вдоль вентральной средней линии, включающую в себя все клетки, которые образуют туловище эмбриона. Зародышевая полоска вытягивается назад и, возможно, из-за капсулы яйца, заворачивается вокруг верхней (дорсальной) поверхности зародыша (рис. 9.7Г). Та-

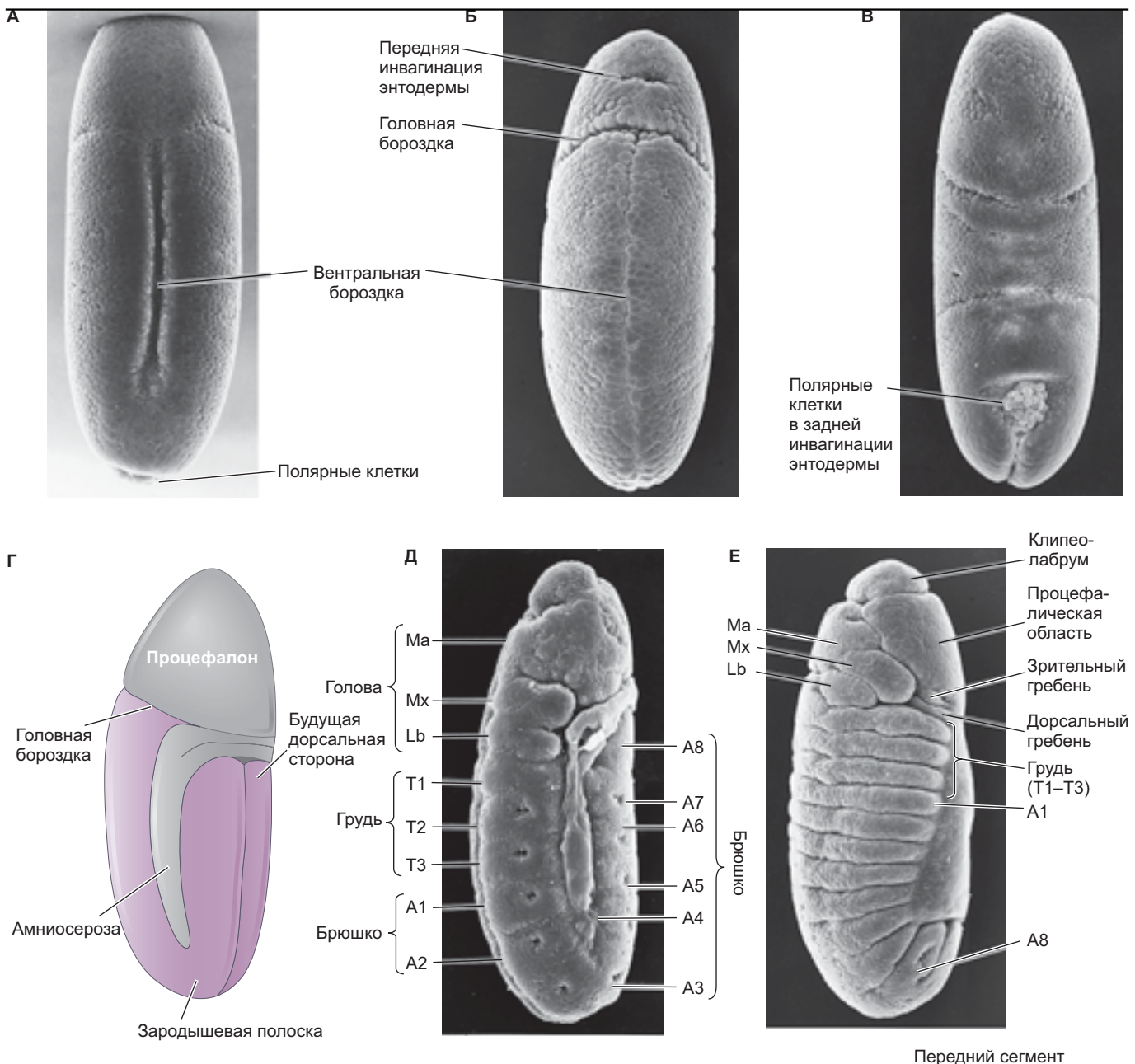


Рис. 9.7. Гаструляция у *Drosophila*. На микрофотографиях передняя часть каждого эмбриона направлена вверх. **А.** Клетки, примыкающие к вентральной средней линии, инвагинируют, и образуется вентральная бороздка. **Б.** После закрывания вентральной бороздки мезодермальные клетки оказываются внутри, а поверхностная эктодерма — по бокам от вентральной средней линии. **В.** Вид с дорсальной стороны на немного более поздний эмбрион; видны полярные клетки и задняя энтодерма, погружающиеся внутрь эмбриона. **Г.** Дорсально-латеральный вид эмбриона в момент самого полного растяжения зародышевой полоски, непосредственно перед сегментацией (схематично). Головная бороздка отделяет будущую область головы (процефалон) от зародышевой полоски, которая сформирует грудь и брюшко. **Д.** Наиболее полное растяжение зародышевой полоски и начало сегментации (вид сбоку). Тонкие углубления отмечают зарождающиеся сегменты вдоль зародышевой полоски. Ma, Mx и Lb — мандибулярный, максиллярный и лабиальный сегменты; T1–T3 — грудные сегменты; A1–A8 — брюшные сегменты. **Е.** Сократившаяся зародышевая полоска. Видны истинные сегменты, а также другие дорсальные области головы: клипеолабрум (зачаток наличника и верхней губы), процефалическая область, зрительный гребень и дорсальный гребень. **Ж.** Недавно вылупившаяся личинка 1-го возраста. (Рис. Г по данным: J. A. Campos-Ortega and V. Hartenstein, 1985. *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag: New York.)

С разрешения: F. R. Turner

ким образом, в конце формирования зародышевой полосы клетки, предназначенные для формирования наиболее задних структур личинки, располагаются непосредственно за будущей областью головы (рис. 9.7Д). В этот момент все три зародышевых листка сформированы, что означает конец гаструляции, однако существует еще несколько важных морфогенетических событий, которым предстоит произойти. С одной стороны начинают появляться сегменты тела, разделяющие эктодерму и мезодерму. Затем зародышевая полоска сжимается, помещая презумптивные задние сегменты на заднем кончике зародыша (рис. 9.7Е, Ж). На дорсальной поверхности две стороны эпидермиса соединяются в процессе, называемом **дорсальным закрытием**. Самая дорсальная структура амниосероза (внезародышевый слой, окружающий эмбрион) взаимодействует с эпидермальными клетками и стимулирует их миграцию (reviewed in Panfilio, 2008; Heisenberg, 2009).

Пока зародышевая полоска находится в растянутом положении, происходит несколько ключевых морфогенетических процессов: органогенез, сегментация (рис. 9.8А) и сегрегация имагинальных дисков. Нервная система формируется из двух областей вентральной эктодермы. Нейробласты (т. е. нейральные клетки-предшественники) дифференцируются из этой нейрогенной эктодермы и мигрируют внутрь в каждом сегменте (а также из несегментированной области головной эктодермы). Таким образом, нервная система у *Drosophila* и других насекомых распо-

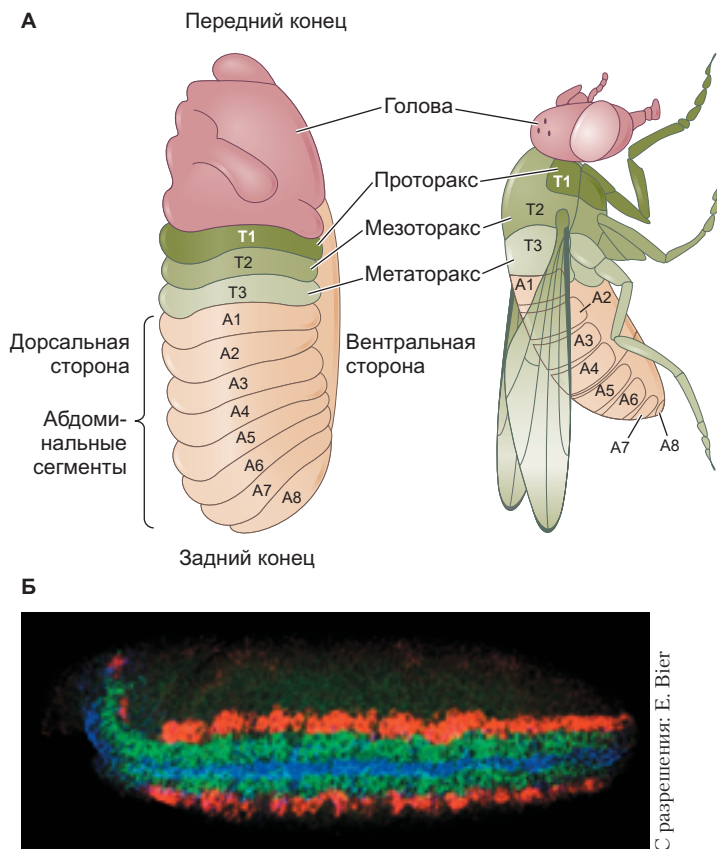
ложена вентрально, а не происходит из дорсальной нервной трубки, как у позвоночных (рис. 9.8Б; см. также рис. 9.28).

Генетические механизмы разметки тела *Drosophila*

Большинство генов, участвующих в формировании личиночных и взрослых форм *Drosophila*, было идентифицировано в начале 1980-х гг. с помощью эффективного метода прямой генетики (т. е. идентификации генов, ответственных за определенный фенотип). Основная стратегия заключалась в том, чтобы случайным образом вызвать мутации у мушек, а затем выявлять мутации, которые нарушали формирование нормального плана тела. Среди этих мутаций встречались довольно фантастические, например у некоторых эмбрионов и взрослых мушек определенные структуры тела либо отсутствовали, либо находились не в том месте. Коллекции мутантов были распространены во многих разных лабораториях. Гены, вовлеченные в возникновение мутантных фенотипов, были секвенированы, и затем охарактеризованы паттерны их экспрессии и функции. Совместные усилия привели к такому пониманию формирования плана тела *Drosophila* на молекулярном уровне, которое не имеет аналогов во всей биологии, и результатом этой работы стала Нобелевская премия по физио-

Рис. 9.8. Формирование осей у *Drosophila*.

А. Сравнение личиночной (слева) и взрослой (справа) сегментации. У взрослой мушки три грудных сегмента различаются по их придаткам: T1 (проторакс) имеет только ноги; T2 (мезоторакс) имеет крылья и ноги; T3 (метаторакс) имеет жужжальца (не видны) и ноги. **Б.** Во время гаструляции мезодермальные клетки в наиболее вентральной области погружаются в эмбрион, а нейрогенные клетки, экспрессирующие ген *Short gastrulation (Sog)*, становятся наиболее вентральными клетками зародыша. *Sog* показан синим; *ventral nervous system defective* показан зеленым; *intermediate neuroblast defective* показан красным. (Личинка по данным: A. Martinez-Arias and P. A. Lawrence, 1985. *Nature* 313: 639–642; взрослая *Drosophila* по данным: M. Peifer et al., 1987. *Genes & Dev* 1: 891–898.)



С разрешения: E. Bier

логии и медицине, присужденная в 1995 г. Эдварду Льюису, Христиане Нюслайн-Фольхард и Эрику Вишаусу.

Далее в этой главе подробно описана генетика развития *Drosophila*, как мы ее поняли за последние три десятилетия. Сначала мы рассмотрим, как передне-заднюю ось эмбриона определяет взаимодействие развивающегося ооцита и окружающих его фолликулярных клеток. Затем мы увидим, как внутри эмбриона формируются дорсально-вентральные морфогенетические градиенты и как они специфицируют разные типы тканей. Наконец, будет кратко показано, как положение эмбриональных тканей относительно двух основных осей определяет их специфицирование к формированию определенных органов.

Сегментация и передне-задняя разметка тела

Процессы эмбриогенеза формально начинаются при оплодотворении, но многие молекулярные события, критически важные для эмбриогенеза *Drosophila*, фактически происходят во время оогенеза. Каждый ооцит возникает от одной женской половой клетки — **оогония**. Перед началом оогенеза оогоний четыре раза делится с неполным цитокинезом, в результате чего образуются 16 связанных друг с другом клеток. Эти 16 клеток зародышевой линии, наряду с окружающим их эпителиальным слоем соматических фолликулярных клеток, составляют **яйцевую камеру**, в которой будет развиваться яйцеклетка. Клетки зародышевой линии включают 15 метаболически активных **питающих клеток**, которые производят мРНК и белки, транспортирующиеся в одну клетку. Эта клетка станет ооцитом. По мере развития предшественника ооцита в заднем конце яйцевой камеры многочисленные мРНК, образующиеся в питающих клетках, транспортируются по микротрубочкам через клеточные соединения в увеличивающийся ооцит.

Генетические исследования, инициированные Нюслайн-Фольхард и Вишаусом, выявили иерархию генов, которые (1) устанавливают передне-заднюю полярность и (2) делят эмбрион на определенное количество сегментов, каждый из которых имеет установленную полярность и различную идентичность (**рис. 9.9**). Эту иерархию создают гены материнского эффекта, транскрипты которых локализованы в разных областях яйца. Данные мРНК кодируют транскрипционные и трансляционные регуляторные белки, которые диффундируют через синцитиальную бластодерму и действуют как морфогены, активируя или подавляя экспрессию определенных зиготических генов.

Первые зиготические гены, которые должны быть экспрессированы, называют **генами пробела** (гаргенами), потому что мутации в них вызывают разрывы в паттерне сегментации. Эти гены экспресси-

руются в определенных частично перекрывающихся доменах шириной около трех сегментов. Гены пробела кодируют факторы транскрипции, различные комбинации и концентрации которых регулируют транскрипцию **генов парного правила** (pair-rule-генов), разделяющих эмбрион на периодические единицы. Транскрипция различных генов парного правила приводит к возникновению полосатого паттерна из семи поперечных поясов, перпендикулярных передне-задней оси. Транскрипционные факторы, кодируемые генами парного правила, активируют **гены сегментной полярности**, мРНК и белковые продукты которых делят эмбрион на 14 единиц шириной в сегмент, устанавливая периодичность зародыша. В то же время белковые продукты генов пробела, парного правила и сегментной полярности взаимодействуют и регулируют другой класс генов, **гомеотические селекторные гены** (homeotic selector), транскрипция которых определяет путь развития каждого сегмента (**рис. 9.9A**).

Материнские градиенты: регуляция полярности цитоплазмы ооцита

Серия экспериментов с наложением лигатур на яйцо в разные периоды развития показала, что развитие насекомых контролируют два организующих центра: формирующий голову центр спереди и формирующий постериорные структуры центр сзади. Эти центры, по-видимому, выделяют вещества, которые генерируют градиент, формирующий голову, и градиент, формирующий хвост. В конце 1980-х гг. градиентная гипотеза была объединена с генетическим подходом к изучению эмбриогенеза *Drosophila*. Если есть градиенты, то каковы морфогены, концентрация которых изменяется в пространстве? Напомним, что морфоген — это секретируемая сигнальная молекула, способная регулировать экспрессию различных генов, в зависимости от времени и концентрации. Каковы были гены, которые сформировали эти морфогенетические градиенты? И функционировали ли морфогены, активируя или ингибируя определенные гены в местах их концентрации? Христиана Нюслайн-Фольхард руководила научной программой, в которой рассматривались эти вопросы. Исследователи обнаружили, что один набор генов кодирует морфогены для передней части эмбриона, другой набор генов кодирует морфогены, ответственные за организацию задней области эмбриона, и третий набор генов кодирует белки, которые обеспечивают формирование концевых областей эмбриона: акрона и хвоста (**табл. 9.1**).

Обнаружено, что две материнские мРНК *bicoid* и *nanos* соответствуют передним и задним центрам сигнализации и инициируют формирование передне-задней оси. Транскрипты *bicoid* расположены рядом с передним концом неоплодотворенной яйцеклетки, а *nanos* — на заднем конце. Распределение этих мРНК

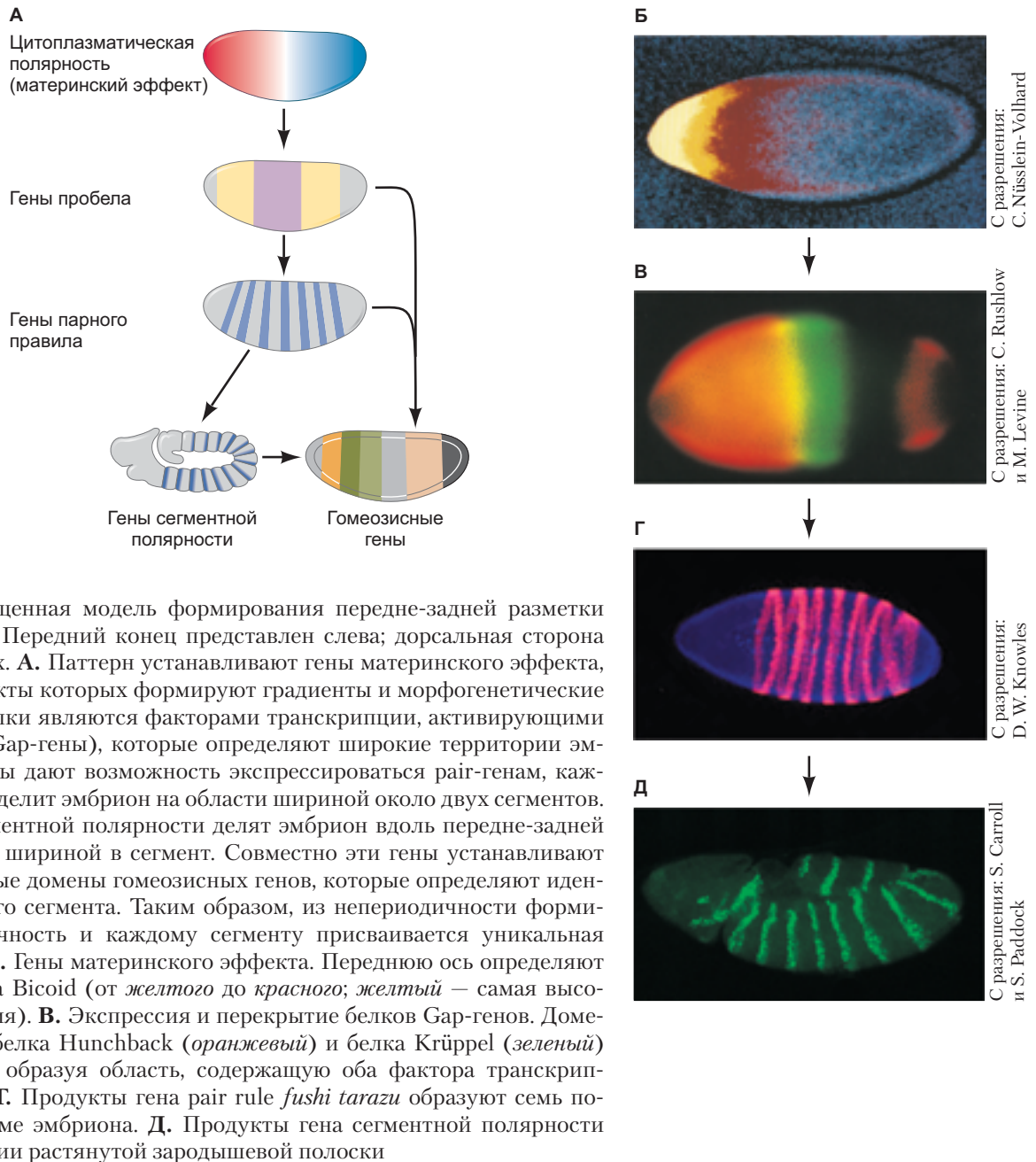


Рис. 9.9. Обобщенная модель формирования передне-задней разметки тела *Drosophila*. Передний конец представлен слева; дорсальная сторона обращена вверх. **А.** Паттерн устанавливают гены материнского эффекта, белковые продукты которых формируют градиенты и морфогенетические области. Эти белки являются факторами транскрипции, активирующими гены пробела (Гар-гены), которые определяют широкие территории эмбриона. Гар-гены дают возможность экспрессироваться *pair*-генам, каждый из которых делит эмбрион на области шириной около двух сегментов. Затем гены сегментной полярности делят эмбрион вдоль передне-задней оси на единицы шириной в сегмент. Совместно эти гены устанавливают пространственные домены гомеозисных генов, которые определяют идентичность каждого сегмента. Таким образом, из неперiodичности формируется периодичность и каждому сегменту присваивается уникальная идентичность. **Б.** Гены материнского эффекта. Переднюю ось определяют градиенты белка Bicoid (от желтого до красного; желтый — самая высокая концентрация). **В.** Экспрессия и перекрытие белков Гар-генов. Домены экспрессии белка Hunchback (оранжевый) и белка Krüppel (зеленый) перекрываются, образуя область, содержащую оба фактора транскрипции (желтый). **Г.** Продукты гена *pair rule fushi tarazu* образуют семь полос в бластомере эмбриона. **Д.** Продукты гена сегментной полярности *engrailed* на стадии растянутой зародышевой полоски

происходит в результате сильной поляризации сетей микротрубочек в развивающемся ооците. После овуляции и оплодотворения мРНК *bicoid* и *nanos* транслируются в белки, которые могут диффундировать в синцитиальную бластодерму, образуя градиенты, имеющие решающее значение для формирования передне-задней разметки (рис. 9.10; см. также рис. 9.9Б).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ВICOID КАК МОРФОГЕН ПЕРЕДНЕЙ ЧАСТИ

То, что Bicoid является головным морфогеном *Drosophila*, было продемонстрировано с помощью экспериментальной схемы «найди, потеряй,

перенеси» (см. гл. 1). Христиана Нюслайн-Фольхард, Вольфганг Дривер и их коллеги (Driever and Nüsslein-Volhard, 1988a, b; Driever et al., 1990) показали, что:

1) белок Bicoid можно обнаружить в градиенте с максимальной концентрацией в передней (формирующей голову) области;

2) эмбрионы без Bicoid не могли образовывать голову;

3) когда мРНК *bicoid* добавляли в разные места Bicoid-дефицитных эмбрионов, место, куда инъецировали мРНК *bicoid*, становилось головой (рис. 9.11).

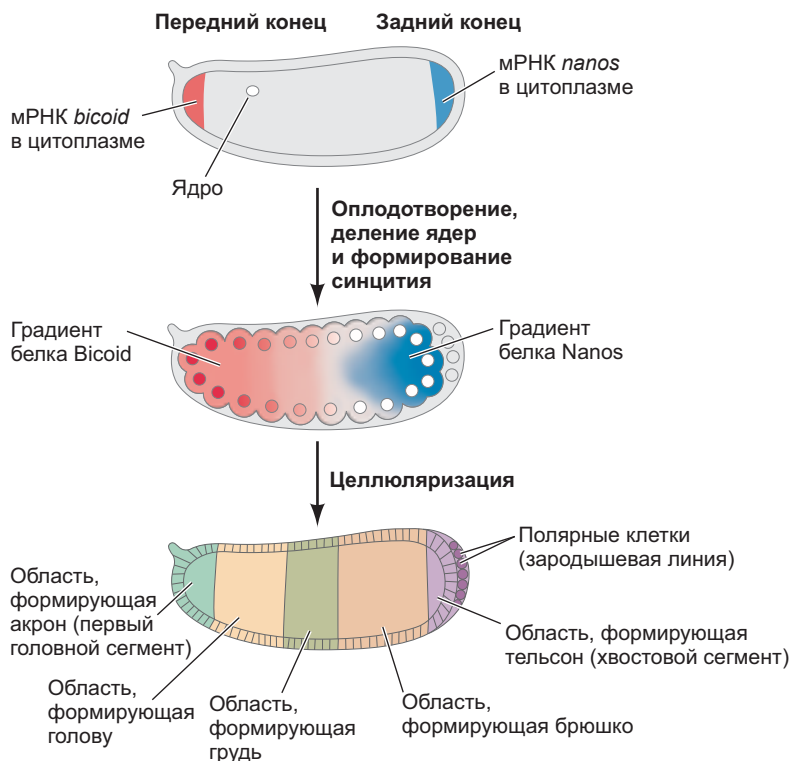
Кроме того, области вокруг места инъекции Bicoid стали грудью, как и ожидалось от сигнала,

ТАБЛИЦА 9.1. Гены материнского эффекта, устанавливающие передне-заднюю полярность эмбриона *Drosophila*

Ген	Мутантный фенотип	Предлагаемая функция
ПЕРЕДНЯЯ ГРУППА		
<i>bicoid</i> (<i>bcd</i>)	Голова и грудь отсутствуют и заменены инвертированным тельсоном	Градиентный передний морфоген; содержит гомеодомен; репрессирует мРНК <i>caudal</i>
<i>exuperantia</i> (<i>exu</i>)	Нет передних головных структур	Заякоривает мРНК <i>bicoid</i>
<i>swallow</i> (<i>swa</i>)	Нет передних головных структур	Заякоривает мРНК <i>bicoid</i>
ЗАДНЯЯ ГРУППА		
<i>nanos</i> (<i>nos</i>)	Нет брюшных структур	Задний морфоген; репрессирует мРНК <i>hunchback</i>
<i>tudor</i> (<i>tud</i>)	Нет брюшных структур и полярных клеток	Локализация мРНК <i>nanos</i>
<i>oskar</i> (<i>osk</i>)	Нет брюшных структур и полярных клеток	Локализация мРНК <i>nanos</i>
<i>vasa</i> (<i>vas</i>)	Нет брюшных структур и полярных клеток; дефектный оогенез	Локализация мРНК <i>nanos</i>
<i>valois</i> (<i>val</i>)	Нет брюшных структур и полярных клеток; дефектная целлюляризация	Стабилизирует комплекс локализации Nanos
<i>pumilio</i> (<i>pum</i>)	Нет брюшных структур	Помогает белку Nanos связаться с мРНК <i>hunchback</i>
<i>caudal</i> (<i>cad</i>)	Нет брюшных структур	Активирует задние концевые гены
ТЕРМИНАЛЬНАЯ ГРУППА		
<i>torsolike</i>	Нет концевых сегментов	Возможный морфоген для концевых сегментов
<i>trunk</i> (<i>trk</i>)	Нет концевых сегментов	Переводит сигнал Torsolike в Torso
<i>fs(1)Nasrat</i> [<i>fs(1)N</i>]	Нет концевых сегментов; разрушенные структуры яйца	Переводит сигнал Torsolike в Torso
<i>fs(1)polehole</i> [<i>fs(1)ph</i>]	Нет концевых сегментов; разрушенные структуры яйца	Переводит сигнал Torsolike в Torso

По данным: К. V. Anderson, 1989. Из: *Genes and Embryos (Frontiers in Molecular Biology series)*, D. M. Glover and B. D. Hames (Eds.) pp. 1–37. IRL: New York.

Рис. 9.10. Синцитиальная спецификация у *Drosophila*. Передне-заднюю спецификацию определяют морфогенетические градиенты в цитоплазме яйца. мРНК *bicoid* стабилизирована в самой передней части яйца, в то время как мРНК *nanos* связан с задним концом. (Передний конец можно распознать по микропиле на оболочке, отверстию для входа сперматозоида.) После откладки и оплодотворения яйца две мРНК транслируются в белки. Белок Bicoid образует градиент с наивысшей концентрацией на переднем конце, а белок Nanos — на заднем. Два белка образуют систему координат, основанную на их соотношении. Таким образом, каждая позиция вдоль оси отличается от любой другой позиции. Когда ядра делятся, каждому ядру присваивается позиционная информация по соотношению этих белков. Белки, формирующие эти градиенты, активируют транскрипцию генов, определяющих идентичность сегментов личинки и взрослой мушки



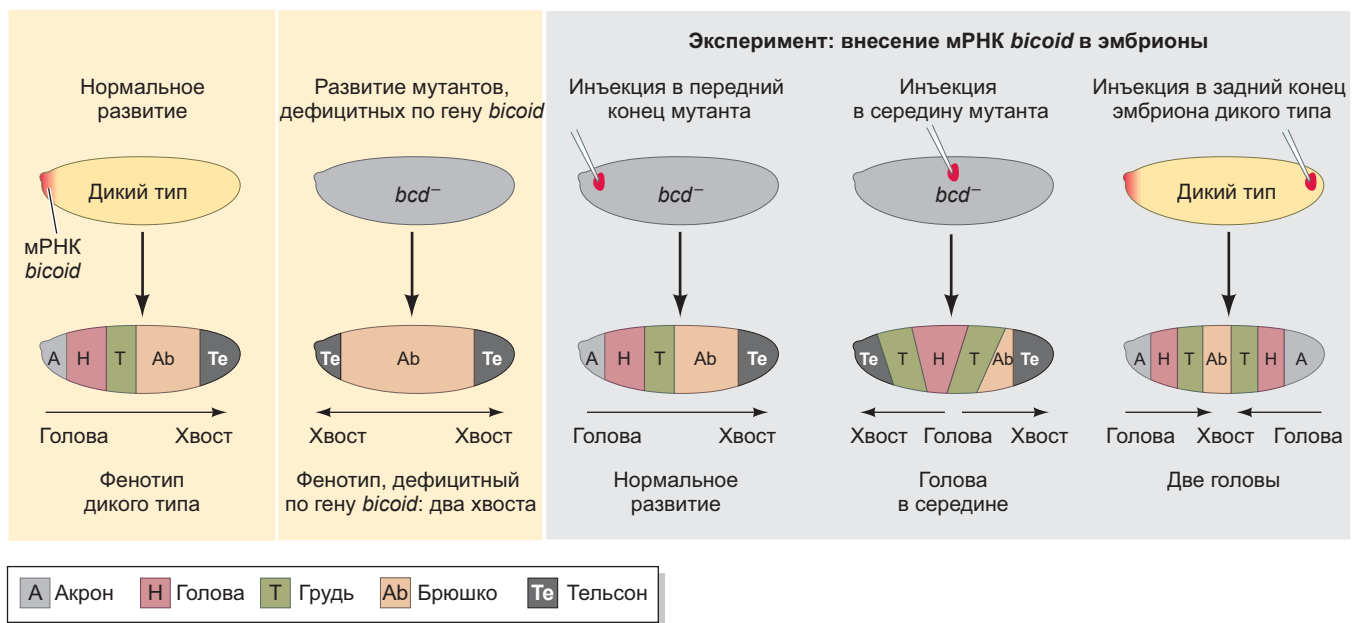


Рис. 9.11. Схематичное изображение экспериментов, демонстрирующих, что ген *bicoid* кодирует морфоген, ответственный за структуры головы у *Drosophila*. Фенотипы эмбрионов, дефицитных по гену *bicoid*, и дикого типа показаны слева. Когда в эмбрионы, дефицитные по гену *bicoid*, инъектируют мРНК *bicoid*, точка инъекции формирует головные структуры. Когда в задний полюс раннего дробящегося эмбриона дикого типа инъектируют мРНК *bicoid*, головные структуры формируются на обоих полюсах. (По данным: W. Driever et al., 1990. *Development* 109: 811–820.)

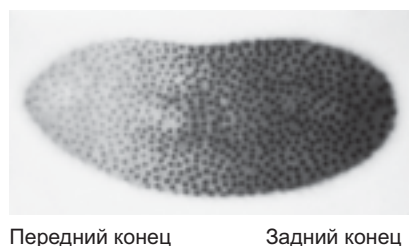
зависящего от концентрации. При введении в переднюю часть *Bicoid*-дефицитных эмбрионов (у матерей которых отсутствовали гены *bicoid*) мРНК *bicoid* «спасала» эмбрионы, и у них развивалась нормальная передне-задняя полярность. Если мРНК *bicoid* вводили в центр эмбриона, то эта средняя область становилась головой, а области по обе стороны от нее становились структурами груди. Если большое количество мРНК *bicoid* вводили в задний конец эмбриона дикого типа (с его собственными эндогенными транскриптами *bicoid* на переднем полюсе), возникали две головы, по одной на каждом конце (Driever et al., 1990).

По завершении оогенеза транскрипты *bicoid* закрепляются на переднем конце ооцита, а *nanos* связывается с задним концом (Frigerio et al., 1986; Berleth et al., 1988; Gavis and Lehmann, 1992; Little et al., 2011). Эти две мРНК бездействуют до овуляции и оплодотворения, после чего они транслируются. Поскольку белковые продукты *Bicoid* и *Nanos* не связаны с цитоскелетом, они диффундируют к средним областям раннего эмбриона, создавая два противоположно направленных градиента, которые устанавливают передне-заднюю полярность эмбриона. Математические модели показывают, что эти градиенты устанавливаются путем диффузии белков и их активной деградации (Little et al., 2011; Liu and Ma, 2011).

ГРАДИЕНТЫ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ ТРАНСЛЯЦИИ

Еще две материнские мРНК — *hunchback* (*hb*); и *caudal* (*cad*) — имеют решающее значение для формирования передней и задней частей разметки тела соответственно (Lehmann and Nüsslein-Volhard, 1987; Wu and Lengyel, 1998). Эти две мРНК синтезируют питающие клетки яичника и затем они транспортируются в ооцит, где равномерно распределяются по синцитиальной бластомере. Возникает вопрос: если они не локализованы, как же они приводят к формированию локализованных паттернов активности? Оказывается, что трансляцию мРНК *hb* и *cad* репрессируют градиенты диффузии белков *Nanos* и *Bicoid* соответственно.

В передней области белок *Bicoid* предотвращает трансляцию *caudal*. *Bicoid* прикрепляется к определенной области 3'-UTR мРНК *caudal*. Здесь он связывает белок *Bin3*, который стабилизирует ингибирующий комплекс, предотвращающий связывание 5'-сара мРНК с рибосомой. Путем привлечения этого ингибитора трансляции *Bicoid* предотвращает трансляцию *caudal* в передней части эмбриона (рис. 9.12; Rivera-Pomar et al., 1996; Cho et al., 2006; Singh et al., 2011). Такая супрессия необходима для нормального развития; если белок *Caudal* вырабатывается в передней части эмбриона, голова и грудная клетка не формируются должным образом. *Caudal*



Из: P. M. Macdonald and G. Struhl, 1986, *Nature* 324: 537–545, с разрешения G. Struhl

Рис. 9.12. Градиент белка Caudal в эмбрионе *Drosophila* дикого типа на стадии синцитиальной бластодермы. Передний конец слева. Белок (окрашенный в темно-серый цвет) проникает в ядра и помогает специфицировать развитие задних клеток

активирует гены, ответственные за инвагинацию задней кишки, и, таким образом, имеет решающее значение для спецификации задних доменов эмбриона.

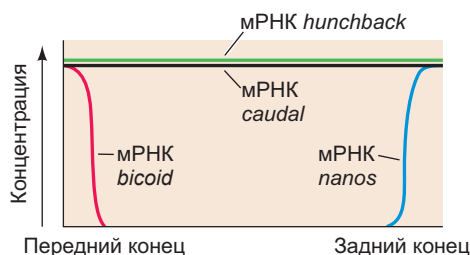
В задней области белок Nanos предотвращает трансляцию *hunchback*. Nanos в задней части эмбриона образует комплекс с несколькими другими убиквитинными белками, включая Pumilio и Brat. Этот комплекс связывается с 3'-UTR мРНК *hunchback*, где он рекрутирует d4EHP и предотвращает присоединение мРНК *hunchback* к рибосомам (Tautz, 1988; Cho et al., 2006).

В результате этих взаимодействий возникает четыре градиента материнских белков у раннего эмбриона (**рис. 9.13**):

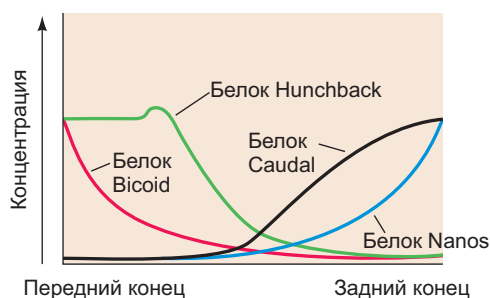
- передне-задний градиент белка Bicoid;
- передне-задний градиент белка Hunchback;
- задне-передний градиент белка Nanos;
- задне-передний градиент белка Caudal.

Теперь все готово для активации зиготических генов в ядрах насекомых, которые были заняты делением, пока устанавливались четыре градиента.

А Ооцитарные мРНК



Б Белки ранних дробящихся эмбрионов



В

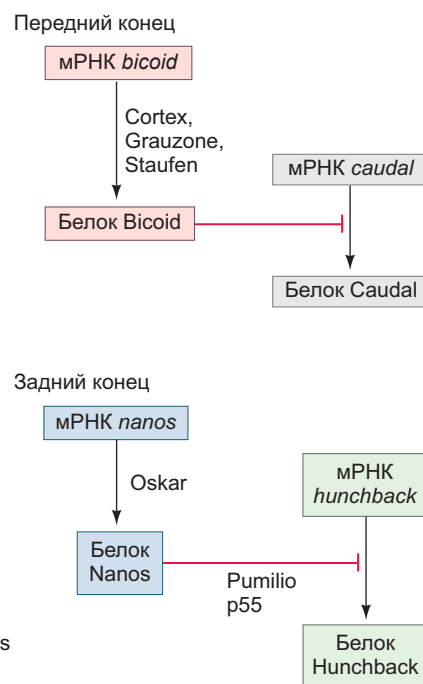


Рис. 9.13. Модель формирования передне-задней полярности генами материнского эффекта *Drosophila*. **А.** мРНК *bicoid*, *nanos*, *hunchback* и *caudal* синтезируются питающими клетками яйчника и накапливаются в яйцеклетке. Транскрипты *bicoid* локализуются спереди; *nanos* — на заднем полюсе. **Б.** После трансляции белок Bicoid формирует градиент от переднего конца эмбриона к заднему, а белок Nanos — от заднего к переднему. Nanos ингибирует трансляцию мРНК *hunchback* (в задней части), в то время как Bicoid предотвращает трансляцию *caudal* (в передней части). Ингибирование приводит к появлению противоположных градиентов белков Caudal и Hunchback. Градиент Hunchback усиливается за счет транскрипции гена *hunchback* в передних ядрах (поскольку Bicoid действует как фактор транскрипции, активируя транскрипцию *hunchback*). **В.** Параллельные взаимодействия, посредством которых трансляционная генная регуляция устанавливает передне-заднюю полярность эмбриона *Drosophila*. (Рис. В по данным: P. M. Macdonald and C. A. Smibert, 1996. *Curr Opin Genet Dev* 6: 403–407.)

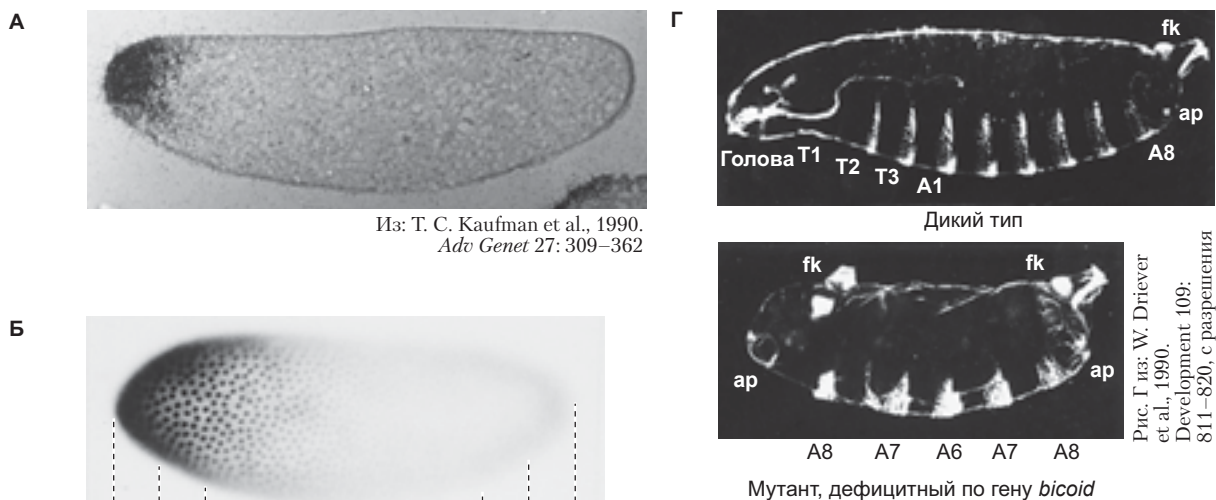


Рис. 9.14. Градиент белка Bicoid у ранних эмбрионов *Drosophila*. **А.** Локализация мРНК *bicoid* на переднем конце эмбриона с выраженным градиентом. **Б.** Градиент белка Bicoid вскоре после оплодотворения. Наибольшая концентрация спереди и снижается в задней части. Обратите также внимание, что Bicoid сосредоточен в ядрах. **В.** Денситометрическое сканирование градиента белка Bicoid. Верхняя кривая (черная) представляет градиент Bicoid у эмбрионов дикого типа. Нижняя кривая (красная) представляет Bicoid у эмбрионов, полученных от самок, мутантных по гену *bicoid*. **Г.** Сильно нарушенный фенотип кутикулы эмбриона, полученного от самки, мутантной по гену *bicoid*, в сравнении с кутикулой дикого типа. Голова и грудная клетка мутанта по *bicoid* заменены вторым набором задних структур тельсона, сокращенно fk (filzkörper) и ap (анальные пластины)

Передний организующий центр: градиенты Bicoid и Hunchback

У *Drosophila* фенотипы мутантов *bicoid* представляют ценную информацию о функции морфогенетических градиентов (рис. 9.14А–В). Вместо наличия передних структур (акрон, голова и грудь), за которыми следуют структуры брюшка и тельсон, план строения мутанта *bicoid* выглядит так: тельсон-брюшко-брюшко-тельсон (рис. 9.14Г). Казалось бы, у этих эмбрионов отсутствуют какие-либо вещества, необходимые для формирования передних структур. Более того, можно предположить, что вещество, которого не хватает этим мутантам, является тем, которое Сандер и Калтофф постулировали для включения генов, необходимых передним структурам, и выключения генов, необходимых структурам тельсона.

Белок Bicoid, по-видимому, действует как морфоген (т. е. вещество, разные концентрации которого по-разному специфицируют пути развития клеток; см. гл. 4). Высокие концентрации Bicoid приводят к образованию передних структур головы. Чуть меньше Bicoid заставляет клетки стать ротовыми частями.

Умеренная концентрация Bicoid инструктирует клетки, как стать грудью, тогда как для брюшка характерно отсутствие Bicoid. Как именно градиент белка Bicoid определяет передне-заднюю ось? Основная его функция заключается в том, чтобы выступать в качестве транскрипционного фактора, который активирует экспрессию генов-мишеней в передней части эмбриона¹. Первой мишенью Bicoid, которая была обнаружена, был ген *hunchback* (*hb*). В конце 1980-х гг. две лаборатории независимо продемонстрировали, что Bicoid связывается с *hb* и активирует его (Driever and Nüsslein-Volhard, 1989; Struhl et al., 1989; Wieschaus, 2016). Bicoid-зависимую транскрип-

¹ Поклонники теории информации замечают, что процесс, с помощью которого передне-задняя информация морфогенетических градиентов переводится в дискретные и различающиеся парасегменты, представляет собой переход от аналоговой спецификации к цифровой. Спецификация является аналоговой, а детерминация — цифровой. Этот процесс позволяет стабилизировать неустойчивую информацию градиентов в синцитиальной бластодерме, чтобы ее можно было использовать намного позже в развитии (Baumgartner and Noll, 1990).

цию *hb* можно наблюдать только в передней половине эмбриона — области, где обнаружен Bicoid. Фактически, Bicoid и Hunchback функционируют синергетически, активируя транскрипцию специфичных для головы генов.

Группа концевых генов

Помимо передних и задних морфогенов, существует третий набор материнских генов, белки которых генерируют несегментированные оконечности передне-задней оси: **акрон** (концевая часть головы, которая включает в себя мозг) и **тельсон** (хвост). Мутации в этих концевых генах приводят к потере как акрона и большинства передних сегментов головы, так и тельсона и большинства задних брюшных сегментов (Degelmann et al., 1986; Klingler et al., 1988).

Обобщение ранней спецификации передне-задней оси у *Drosophila*

Передне-заднюю ось эмбриона *Drosophila* определяет три набора генов:

- 1. Гены переднего организующего центра.** Расположенный на переднем конце эмбриона, передний организующий центр действует через градиент белка Bicoid. Bicoid функционирует как *транскрипционный фактор* для активации передних Гар-генов и как *репрессор трансляции* для подавления задних генов пробела.
- 2. Гены заднего организующего центра.** Задний организующий центр расположен у заднего полюса. Через белок Nanos он *трансляционно* ингибирует передние образования и через белок Caudal *транскрипционно* активирует гены, формирующие брюшко.
- 3. Гены концевых областей.** Границы акрона и тельсона определяет продукт гена *torso*, который активируется на кончиках зародыша.

Следующим шагом в развитии будет использование этих градиентов факторов транскрипции для активации специфичных генов вдоль передне-задней оси.

Гены сегментации

Определение пути развития (коммитирование) клеток *Drosophila*, по-видимому, проходит в два этапа: спецификация и детерминация (Slack, 1983). В начале развития мушки жизнь клетки зависит от сигналов, обеспечиваемых градиентами белков. Это гибкая спецификация, она может быть изменена в ответ на сигналы от других клеток. Однако в конце концов клетки претерпевают переход от свободного типа коммити-

ТАБЛИЦА 9.2. Главные гены, влияющие на паттерн сегментации у *Drosophila*

Категория	Название генов
Гар-гены	<i>Krüppel (Kr)</i> <i>knirps (kni)</i> <i>hunchback (hb)</i> <i>giant (gt)</i> <i>tailless (tll)</i> <i>huckebein (hkb)</i> <i>buttonhead (btd)</i> <i>empty spiracles (ems)</i> <i>orthodenticle (otd)</i>
Pair rule гены (первичные)	<i>hairy (h)</i> <i>even-skipped (eve)</i> <i>runt (run)</i>
Pair rule гены (вторичные)	<i>fushi tarazu (ftz)</i> <i>odd-paired (opa)</i> <i>odd-skipped (odd)</i> <i>sloppy-paired (slp)</i> <i>paired (prd)</i>
Гены сегментной полярности	<i>engrailed (en)</i> <i>wingless (wg)</i> <i>cubitus interruptus (ci)</i> <i>hedgehog (hh)</i> <i>fused (fu)</i> <i>armadillo (arm)</i> <i>patched (ptc)</i> <i>gooseberry (gsb)</i> <i>pangolin (pan)</i>

рования к необратимой детерминации. В этот момент их траектории становятся неотделимы от них.

Переход от спецификации к дифференцировке у *Drosophila* опосредован **генами сегментации**, которые разделяют ранний эмбрион на повторяющуюся серию зачатков сегментов вдоль передне-задней оси. Гены сегментации были первоначально определены зиготическими мутациями, нарушавшими план тела, и были разделены на три группы в зависимости от их мутантных фенотипов (**табл. 9.2**; Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980):

- *Мутанты Гар-генов* лишены больших участков тела (несколько смежных сегментов; **рис. 9.15А**).
- *Мутанты генов Pair rule* не имеют частей каждого второго сегмента (рис. 9.15Б).
- *Мутанты сегментной полярности* имеют дефекты (делеции, дупликации, изменения полярности) в каждом сегменте (рис. 9.15В).

Сегменты и парасегменты

Мутации в генах сегментации приводят к отсутствию у эмбриона *Drosophila* определенных сегментов или их частей. Однако первые исследователи обнаружили удивительный признак этих мутаций: многие

Гар-гены

Гены пробела активируются или репрессируются генами материнского эффекта и экспрессируются в одном или двух широких доменах вдоль передне-задней оси. Эти паттерны экспрессии довольно хорошо коррелируют с областями зародыша, которые отсутствуют у мутантов пробела. Например, *Krüppel* экспрессируется в основном в парасегментах 4–6, в центре эмбриона (см. рис. 9.9В и 9.15А); в отсутствие белка *Krüppel* у зародыша отсутствуют парасегменты из этих областей.

Делеции, вызванные мутациями в трех гар-генах *hunchback*, *Krüppel* и *knirps*, охватывают весь сегментированный участок эмбриона *Drosophila*. Гар-ген *giant* перекрывается с этими тремя, а гар-гены *tailless* и *huckebein* экспрессируются в доменах на переднем и заднем концах зародыша. Четыре туловищных гар-гена вместе обладают достаточной специфичностью, чтобы определить местоположение клетки вдоль передне-задней оси эмбриона с погрешностью всего около 1%. При взаимодействии продуктов этих гар-генов каждой клетке, по-видимому, присваивается уникальная пространственная идентичность (Dubuis et al., 2013).

Паттерны экспрессии гар-генов очень динамичны. Эти гены обычно транскрипционно активны на низком уровне по всему эмбриону и консолидируются в отдельные области высокой активности по мере деления ядер (Jäckle et al., 1986). Градиент белка *Hunchback* особенно важен при установлении начальных паттернов экспрессии гар-генов. К концу 12-го деления ядер *Hunchback* обнаруживают на высоком уровне в передней части эмбриона. *Hunchback* тогда формирует крутой градиент приблизительно через 15 ядер около середины эмбриона (см. рис. 9.9В и 9.13Б). Задняя треть зародыша в это время имеет неопределяемые уровни *Hunchback*.

Паттерны транскрипции передних гар-генов иницируются различными концентрациями белков *Hunchback* и *Bicoid*. Высокие уровни *Bicoid* и *Hunchback* индуцируют экспрессию *giant*, в то время как транскрипты *Krüppel* появляются в области, где концентрация *Hunchback* начинает уменьшаться. Высокая концентрация *Hunchback* (в отсутствие *Bicoid*) предотвращает также транскрипцию задних генов пробела (таких как *knirps* и *giant*) в передней части эмбриона (Struhl et al., 1992). Считается, что градиент белка *Caudal*, с наивысшей концентрацией на заднем полюсе, ответственен за активацию брюшных гар-генов *knirps* и *giant* в задней части эмбриона. Таким образом, ген *giant* имеет два способа активации (Rivera-Pomar et al., 1995; Schulz and Tautz, 1995): один для передней полосы экспрессии (через белки *Bicoid* и *Hunchback*), другой для задней полосы экспрессии (с помощью белка *Caudal*).

После того как исходные паттерны экспрессии гар-генов установлены с помощью градиентов белков

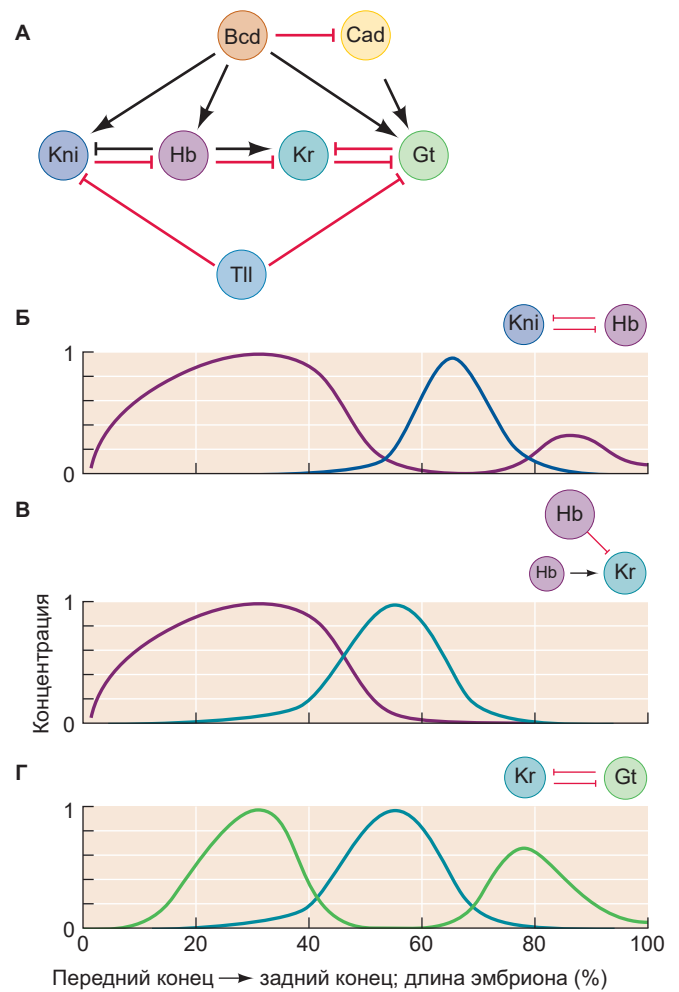
материнского эффекта и *Hunchback*, они стабилизируются и поддерживаются с помощью репрессивных взаимодействий различных продуктов самих генов пробела. (Взаимодействиям способствует тот факт, что они происходят внутри синцития, в котором клеточные мембраны еще не сформированы.) Считается, что эти образующие границы ингибирования опосредованы непосредственно продуктами гар-генов, потому что все четыре основных гар-гена *hunchback*, *giant*, *Krüppel* и *knirps*, кодируют ДНК-связывающие белки (Knipple et al., 1985; Gaul and Jäckle, 1990; Capovilla et al., 1992). Одна такая модель, созданная с помощью генетических экспериментов, биохимических анализов и математического моделирования, представлена на рис. 9.17А (Papatsenko and Levine, 2011). Модель изображает сеть с тремя основными переключателями (рис. 9.17Б–Г). Два из них — это сильное взаимное ингибирование между *Hunchback* и *Knirps* и сильное взаимное ингибирование между *Giant* и *Krüppel* (Jaeger et al., 2004). Третий переключатель — зависящее от концентрации взаимодействие *Hunchback* и *Krüppel*. При высоких дозах *Hunchback* ингибирует синтез белка *Krüppel*, но при умеренных дозах (на уровне около 50% длины эмбриона) *Hunchback* способствует образованию *Krüppel* (см. рис. 9.17В).

Конечным результатом репрессивных взаимодействий является создание точной системы перекрывающихся паттернов экспрессии мРНК. Каждый домен служит источником для диффузии белков гар-генов в соседние области эмбриона, что создает значительное перекрытие (как минимум восемь ядер, на которые приходится около двух зачатков сегментов) между смежными доменами белков пробела. Это впечатляющим образом было продемонстрировано Станоевичем с сотрудниками (1989). Они фиксировали клеточные бластодермы (см. рис. 9.4), окрашивали белок *Hunchback* антителами, несущими красный краситель, и одновременно окрашивали белок *Krüppel* антителами, несущими зеленый краситель. Клеточные участки, содержавшие оба белка, связывали оба антитела и окрашивались в ярко-желтый цвет (см. рис. 9.9В). *Krüppel* аналогичным образом перекрывается с *Knirps* в задней области эмбриона (Pankratz et al., 1990). Точность этих паттернов поддерживается наличием у генов пробела дублирующих энхансеров; если один из энхансеров не работает, существует высокая вероятность того, что другой все еще будет функционировать (Perry et al., 2011).

Гены pair rule

Первым признаком сегментации эмбриона *Drosophila* является экспрессия генов *pair rule* в течение 13-го цикла деления ядер, когда на периферии эмбриона начинают оформляться клетки. Паттерны транскрип-

Рис. 9.17. Архитектура сети гар-генов. Эти взаимодействия обусловлены математическим моделированием, генетическими данными и биохимическим анализом. **А.** Передне-задний градиент Bicoid (Bcd) и Caudal (Cad) регулирует экспрессию Knirps (Kni), Hunchback (Hb), Krüppel (Kr; слабо активируется и Bicoid, и Caudal) и Giant (Gt). Tailless (Tll) инактивирует пути формирования паттернов на концах зародыша. **Б–Г.** Три «переключателя», активация которых вдоль передне-задней оси устанавливает домены генов про-бела. **Б.** Взаимное ингибирование Knirps и Hunchback позиционирует домен белка Knirps на уровне примерно 60–80% вдоль передне-задней оси. **В.** Hunchback ингибирует экспрессию Krüppel в высоких концентрациях, но способствует ей в промежуточных концентрациях. **Г.** Krüppel и Giant взаимно подавляют синтез друг друга. (По данным: D. Papatsenko and M. Levine, 2011. *PLOS ONE* 6: e21145/CC BY 4.0.)



ции этих генов делят эмбрион на области, которые являются предшественниками сегментарного плана тела. Как видно на **рис. 9.18** (и на рис. 9.9Г), одна вертикальная полоса ядер (клетки только начинают формироваться) экспрессирует ген парного правила, соседняя полоса ядер не экспрессирует его, а следующая полоса опять экспрессирует ген *pair rule*. Результатом является паттерн «полос зебры» вдоль передне-задней оси, разделяющий эмбрион на 15 субъединиц (Hafen et al., 1984). В настоящее время известно, что восемь генов способны разметить ранний эмбрион таким образом, и они перекрываются друг с другом, чтобы дать каждой клетке в парасегменте определенный набор факторов транскрипции (см. табл. 9.2).

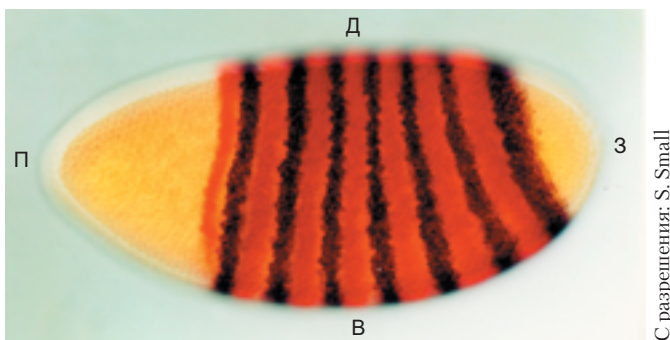


Рис. 9.18. Паттерны экспрессии матричной РНК двух генов *pair rule* *even-skipped* (красный) и *fushi tarazu* (черный) в бластодерме *Drosophila*. Каждый ген экспрессируется в серии из семи полос. Передний конец показан слева, дорсальная сторона — сверху

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Не пропусти этот сегмент!

Один из наиболее изученных первичных генов *pair rule* называют *even-skipped* (буквально «четные пропускаются») (**рис. 9.19**). Его энхансерная область состоит из модульных блоков, расположенных таким образом, что каждый энхансер регулирует отдельную полосу или пару полос. Например, полосу 2 экспрессии *even-skipped* контролирует область в 500 п. н., которую активируют Bicoid и Hunchback и репрессируют белки Giant и Krüppel (**рис. 9.20**; Small et al., 1991, 1992; Stanojević et al., 1991; Janssens et al., 2006). Переднюю границу поддерживает репрессивное влияние Giant, а заднюю границу поддерживает Krüppel. Исследование методом футпринтинга ДНКазой I показало, что минимальная энхансерная область для этой полосы содержит пять сайтов связывания для Bicoid, один для Hunchback, три для Krüppel и три для Giant. Таким образом, считается, что этот регион действует как переключатель, который может непосредственно определять концентрации

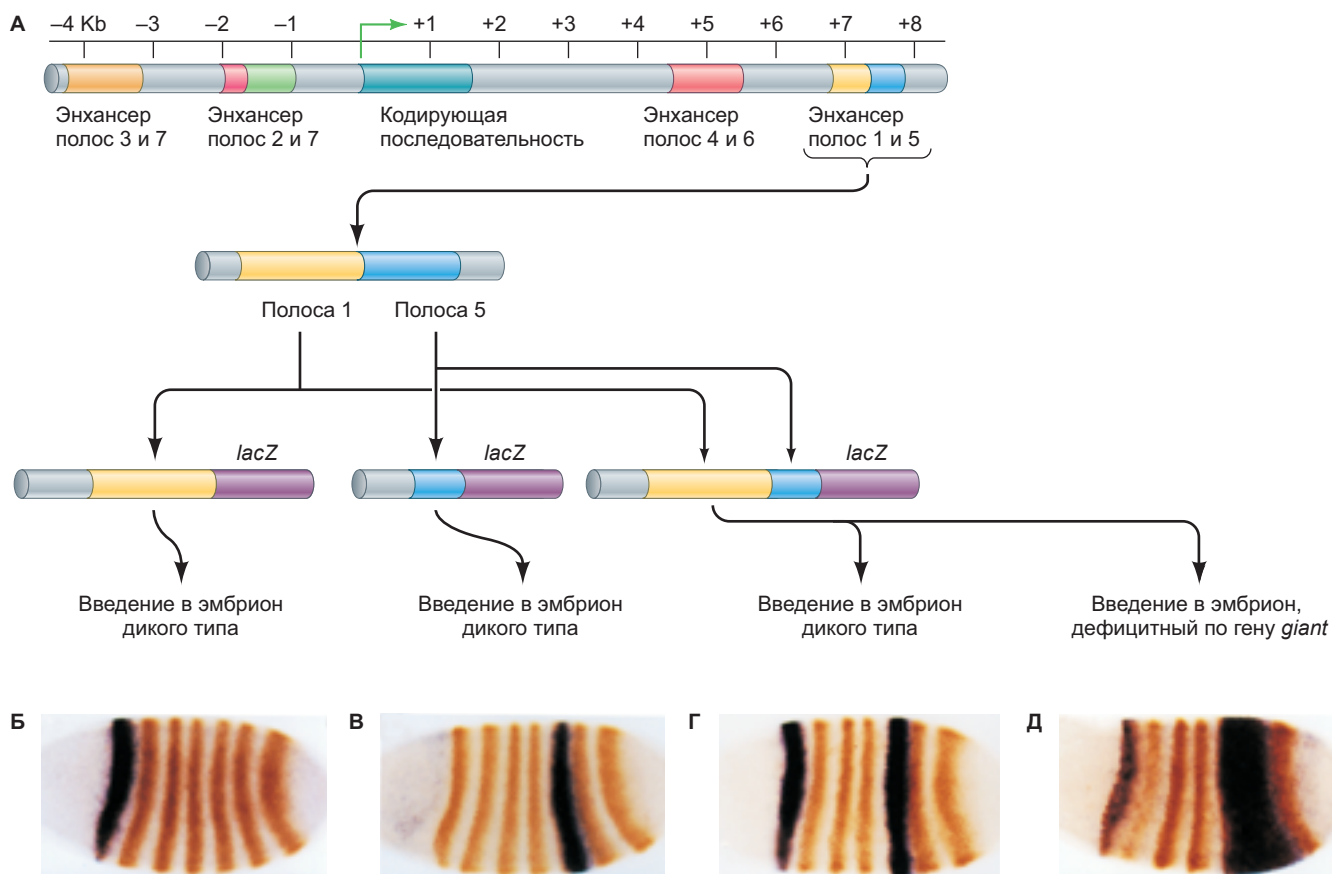


Рис. Б–Д из: M. Fujioka et al., 1999. *Development* 126: 2527–2538, с разрешения M. Fujioka и J. B. Jaynes

Рис. 9.19. Специфичные промоторные области гена *even-skipped* (*eve*) контролируют специфичные полосы его транскрипции в эмбрионе. **А.** Частичная карта промотора *eve*, с указанием областей, ответственных за различные полосы. **Б–Д.** Репортерный ген β -галактозидазы (*lacZ*) был слит с различными областями промотора *eve* и введен в эмбрионы. Полученные зародыши окрашивали (оранжевые полосы) на наличие белка Even-skipped. **Б–Г.** Эмбрионы дикого типа, которым инъецировали *lacZ*-трансгены, содержащие энхансерную область, специфичную для полоски 1 (Б), полоски 5 (В) или обеих областей (Г). **Д.** Область энхансера для полосок 1 и 5 вводили в эмбрион, дефицитный по гену *giant*. Здесь задняя граница полосы 5 отсутствует. (Рис. А по данным: C. Sackerson et al., 1999. *Dev Biol* 211: 39–52.)

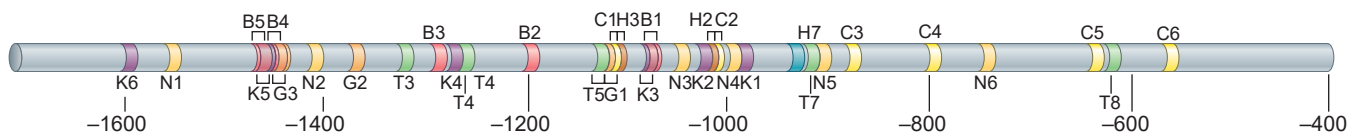


Рис. 9.20. Модель формирования полосы 2 транскрипции гена *even-skipped*. Энхансер, регулирующий полосу 2, содержит последовательности связывания для нескольких белков генов материнского эффекта и пробела. Активаторы (например, Bicoid и Hunchback) отмечены выше линии; репрессоры (например, Krüppel и Giant) показаны ниже. Обратите внимание, что почти каждый сайт активатора тесно связан с сайтом репрессора, что предполагает их конкурентное взаимодействие за эти позиции. (Более того, белок, который является репрессором для полосы 2, может быть активатором для полосы 5; это зависит от того, какие белки связываются рядом с ними.) В — Bicoid; С — Caudal; G — Giant; H — Hunchback; K — Krüppel; N — Knirps; T — Tailless. (По данным: H. Janssens et al., 2006. *Nat Genet* 38: 1159–1165.)

данных белков и принимать решения о включении/выключении транскрипции.

Важность энхансерных элементов может быть показана как генетическими, так и биохимическими методами. Во-первых, мутация в конкретном энхансере удаляет его конкретную полосу и никакую другую. Во-вторых, если репортерный ген (такой как *lacZ*, который кодирует β -галактозидазу) слить с одним из энхансеров, он будет экспрессироваться только в этой конкретной полосе (см. рис. 9.19; Fujioaka et al., 1999). В-третьих, расположение полос может быть изменено путем удаления генов пробела, которые их регулируют. Таким образом, размещение полос является результатом действия: 1) модульных *цис*-регуляторных энхансерных элементов генов *pair rule*; 2) *транс*-регулярных белков гар-генов и материнских генов, которые связываются с этими энхансерными сайтами.

Основные гены *pair rule* включают в себя *hairy*, *even-skipped* и *runt*, каждый из которых экспрессируется в семи полосах. Все три гена строят свои полосатые паттерны с нуля, используя различные энхансеры и регуляторные механизмы для каждой полосы. Энхансеры нередко являются модульными: контроль над экспрессией в каждой полосе находится в дискретной области ДНК, которая часто содержит сайты связывания, распознаваемые факторами

транскрипции семейства гар-белков. Считается, что различные концентрации гар-белков определяют, будет ли транскрибироваться ген *pair rule*.

После того как паттерн транскрипции первичных генов *pair rule* инициирован белками гар-генов, он стабилизируется за счет взаимодействия их продуктов (Levine and Harding, 1989). Первичные гены *pair rule* формируют также контекст, который позволяет или ингибирует экспрессию вторичных генов *pair rule*, таких как *fushi tarazu* (*ftz*; **рис. 9.21**). Все восемь известных генов *pair rule* экспрессируются в полосатых паттернах, не совпадающих друг с другом. Скорее, каждый ряд ядер в парасегменте имеет свой собственный набор продуктов генов *pair rule*, который отличает его от любого другого ряда. Эти продукты активируют следующий уровень генов сегментации, генов сегментной полярности.

Гены сегментной полярности

До сих пор мы описывали взаимодействия молекул внутри синцитиального эмбриона. Но клетки начинают контактировать уже сразу после образования. Эти межклеточные взаимодействия опосредованы генами сегментной полярности, и они решают две важные задачи: во-первых, усиливают парасегментарную периодичность, установленную более ранними



Рис. А и Б с разрешения: Т. Kaufman



С разрешения: Т. Каг

Рис. 9.21. Дефекты развития мутанта *fushi tarazu*. Передний конец находится слева; дорсальная сторона — сверху. **А.** Электронная микрофотография эмбриона дикого типа (вид сбоку). **Б.** Эмбрион, мутантный по *fushi tarazu* на той же стадии развития. Белые линии соединяют гомологичные части сегментированной зародышевой полоски. **В.** Схема сегментации эмбриона дикого типа. Области, выделенные фиолетовым цветом, показывают парасегменты зародышевой полоски, отсутствующие у мутантного эмбриона. **Г.** Паттерн транскрипции гена *fushi tarazu*. (Рис. В по данным: Т. С. Kaufman et al., 1990. *Adv Genet* 27: 309–362.)

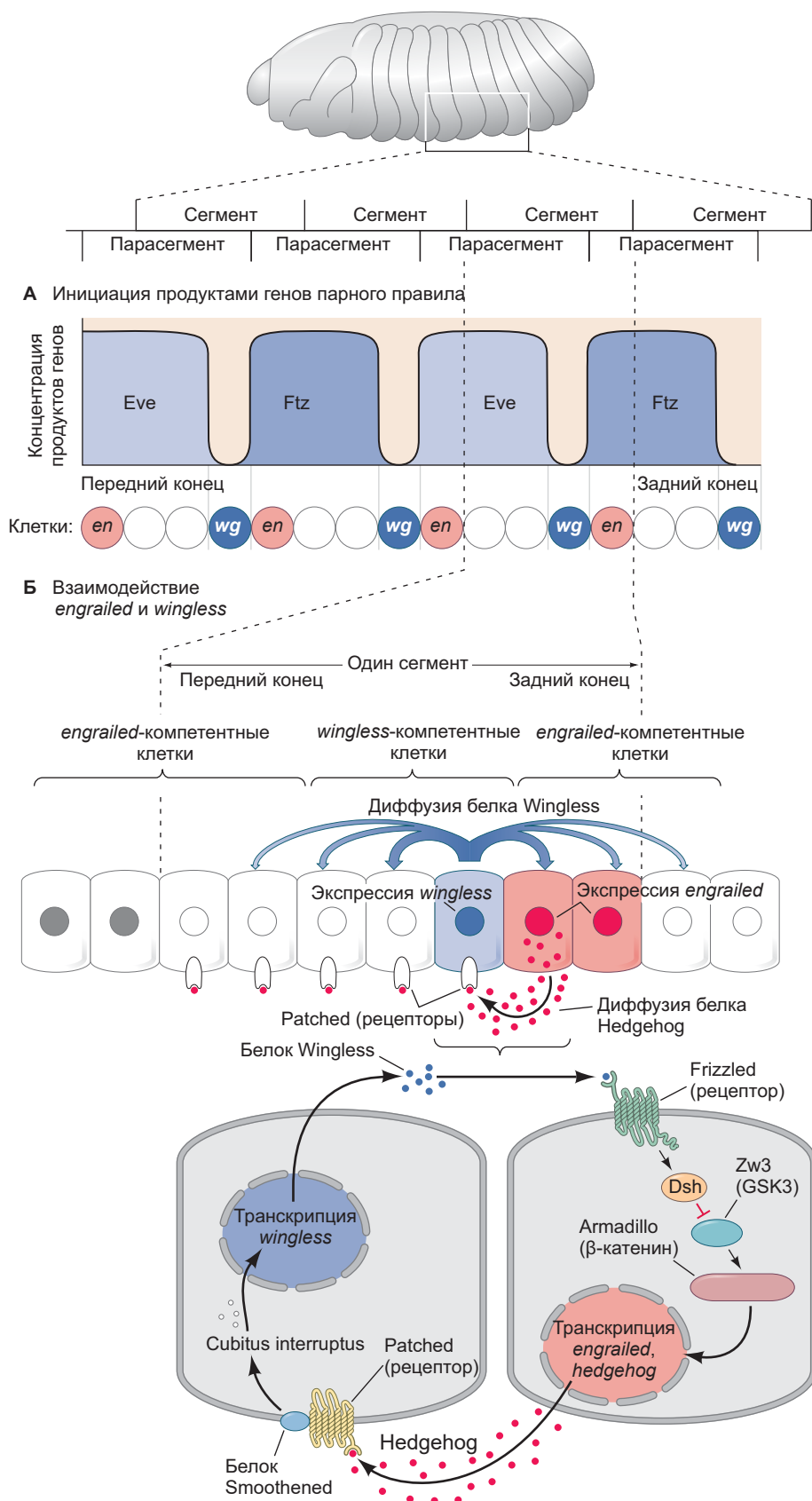


Рис. 9.22. Модель транскрипции генов сегментной полярности *engrailed* (*en*) и *wingless* (*wg*). **А.** Экспрессию *wg* и *en* иницируют гены pair rule. Ген *en* экспрессируется в клетках, содержащих высокие концентрации белков Even-skipped или Fushi tarazu. Ген *wg* транскрибируется, когда и ген *eve*, и ген *ftz* не активны, но когда экспрессируется третий ген (возможно, *sloppy-paired*). **Б.** Продолжение экспрессии *wg* и *en* обусловлено взаимодействием Engrailed- и Wingless-экспрессирующих клеток. Белок Wingless секретируется и диффундирует к окружающим клеткам. В клетках, которые способны экспрессировать Engrailed (т. е. имеющих белки Eve или Ftz), белок Wingless связывается с рецепторными белками Frizzled и Lrp6, что обеспечивает активацию гена *en* через Wnt-сигнальный путь. (Armadillo — название β-катенина *Drosophila*.) Белок Engrailed активирует транскрипцию гена *hedgehog*, а также собственную (*en*) транскрипцию. Белок Hedgehog диффундирует из этих клеток и связывается с рецепторным белком Patched на соседних клетках. Сигнал Hedgehog обеспечивает транскрипцию гена *wg* и последующую секрецию белка Wingless (Sánchez et al., 2008). (По данным: M. S. Levine and K. W. Harding, 1989. Из: D. M. Glover and B. D. Hames [Eds.], *Genes and Embryos*. IRL, New York, pp. 39–94; M. Peifer and A. Bejovec, 1992. *Trends Genet* 8: 243–249; E. Siegfried et al., 1994. *Nature* 367: 76–80.)

факторами транскрипции; во-вторых, с помощью межклеточной сигнализации в каждом парасегменте устанавливаются пути развития клеток.

Гены сегментной полярности кодируют белки, которые являются составляющими сигнальных путей Wnt и Hedgehog (Ingham, 2016; см. гл. 4, рис. 4.22 и 4.26). Мутации в этих генах приводят к дефектам сегментации и измененным паттернам экспрессии в каждом парасегменте. Развитие нормального паттерна определяется тем, что в каждом парасегменте экспрессия белка Hedgehog возможна только в одном ряду клеток, и только один ряд клеток может экспрессировать белок Wingless. (Wingless — белок Wnt *Drosophila*.) Ключом к этому паттерну является активация гена *engrailed* (*en*) в тех клетках, которые будут экспрессировать Hedgehog. Ген *engrailed* активируется в клетках с высоким уровнем факторов транскрипции Even-skipped, Fushi tarazu или Paired; *engrailed* репрессируется в клетках с высоким уровнем белков Odd-skipped, Runt или Sloppy-paired. В результате белок Engrailed обнаруживается в 14 полосах вдоль передне-задней оси зародыша (см. рис. 9.9Д). (И действительно, у эмбрионов, дефицитных по *ftz*, экспрессируется только семь полос.)

Полосы транскрипции *engrailed* отмечают передний компартмент каждого парасегмента (и задний компартмент каждого сегмента). Ген *wingless* (*wg*) активируется в тех полосах клеток, которые получают мало или вообще не содержат белок Even-skipped или Fushi tarazu, но содержат белок Sloppy-paired. Данный паттерн приводит к тому, что *wingless* транскрибируется исключительно в колонке клеток, расположенных непосредственно перед клетками, где транскрибируется *engrailed* (рис. 9.22А).

После того как паттерны экспрессии *wingless* и *engrailed* установлены в соседних клетках, эти паттерны необходимо поддерживать, чтобы сохранить парасегментарную периодичность плана тела. Следует помнить, что мРНК и белки, участвующие в инициации данных паттернов, недолговечны и что паттерны должны сохраняться после того, как их инициаторы больше не синтезируются. Поддержание этих паттернов регулируется взаимодействием соседних клеток: клетки, секретирующие белок Hedgehog, активируют экспрессию *wingless* у своих соседей, а сигнал белка Wingless, который получают клетки, секретирующие Hedgehog, служит для поддержания экспрессии *hedgehog* (*hh*) (рис. 9.22Б). Белок Wingless действует и аутокринно, поддерживая свою экспрессию (Sánchez et al., 2008).

Предполагается, что диффузия этих белков обеспечивает градиенты, по которым клетки парасегмента приобретают свою идентичность. Данный процесс можно увидеть в дорсальном эпидермисе, где ряды личиночных клеток производят различные кутикулярные структуры в зависимости от их положения в сегменте. Ряд клеток 1° состоит из больших пигментированных колючек, называемых зубчиками. Позади этих клеток

ряд 2° производит гладкую эпидермальную кутикулу. Следующие два ряда клеток обозначают как 3°, и они развиваются, образуя маленькие густые волоски; за ними следуют несколько рядов клеток, обозначенные как 4°, образующие тонкие волоски (рис. 9.23).

Гомеозисные селекторные гены

После того как установлены границы сегментов, гены *pair rule* и *gap*-гены взаимодействуют, регулируя го-

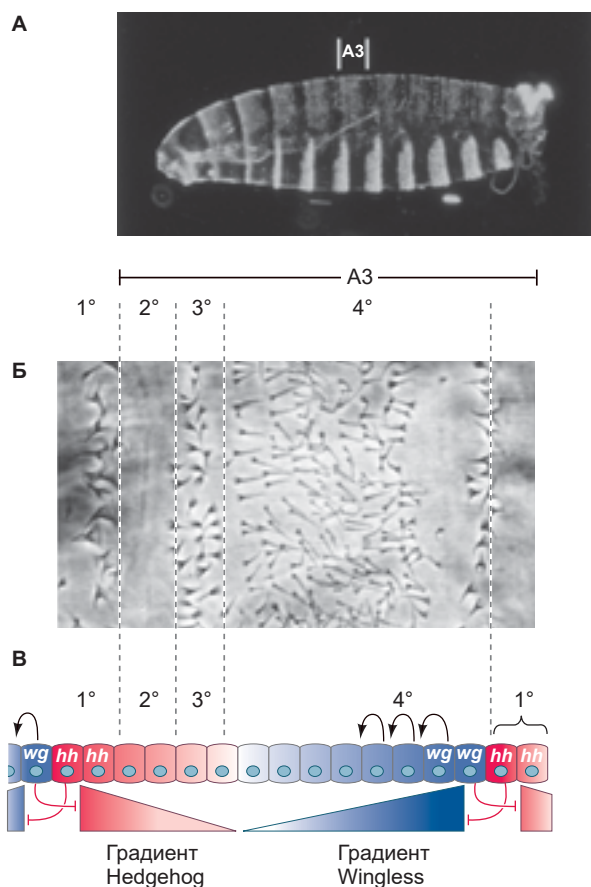


Рис. 9.23. Спецификация клеток центром сигнализации Wingless/Hedgehog. **А.** Фотография эмбриона *Drosophila* дикого типа в темном поле; показано положение третьего брюшного сегмента. Передний конец слева; дорсальная сторона сверху. **Б.** На крупном плане дорсальной области сегмента A3 видны различные кутикулярные структуры, состоящие из рядов клеток 1°, 2°, 3° и 4°. **В.** Модель роли сигналов Wingless и Hedgehog, каждый из которых отвечает примерно за половину паттерна. Каждый сигнал действует либо через градиент, уменьшающийся с расстоянием от их соответствующего источника, и специфицирует статус клеток на расстоянии от этих источников, либо локально на соседние клетки, запуская в них каскад индукций (последовательные стрелки). (По данным: J. Heemskerk and S. DiNardo, 1994. *Cell* 76: 449–460.)

меозисные селекторные гены, которые определяют характерные структуры каждого сегмента (Lewis, 1978). К концу стадии клеточной бластодермы каждый зачаток сегмента приобретает индивидуальность благодаря уникальному сочетанию продуктов гар-генов, pair rule и гомеозисных генов (Levine and Harding, 1989). Большинство гомеозисных генов *Drosophila* содержится в двух областях хромосомы

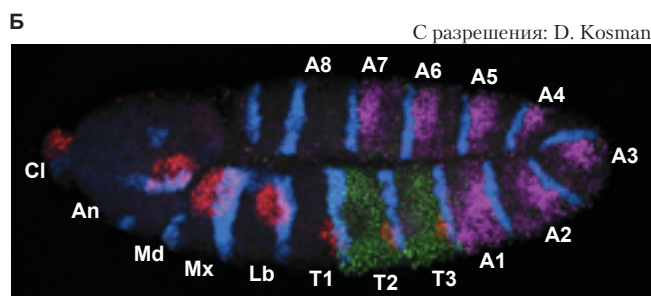
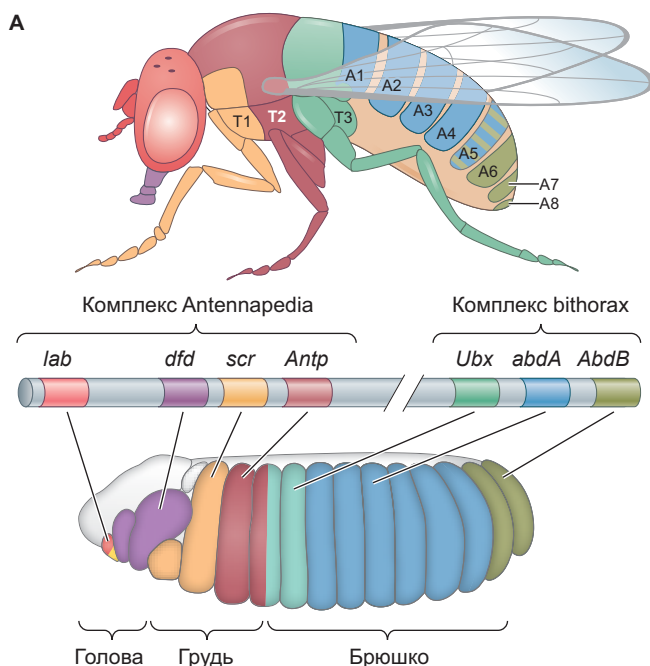


Рис. 9.24. Экспрессия гомеозисных генов у *Drosophila*. **А.** Карта экспрессии гомеозисных генов. В центре находятся гены комплексов Antennapedia и bithorax и их функциональные домены. Ниже и выше генной карты показаны области экспрессии гомеозисных генов (как мРНК, так и белков) в бластодерме эмбриона *Drosophila* и области, которые образуются из них у взрослой мушки. **Б.** Гибридизация *in situ* для четырех генов на более поздней стадии (растянутая зародышевая полоска). Паттерн экспрессии *engrailed* (синий) разделяет тело на сегменты; *Antennapedia* (зеленый) и *Ultrabithorax* (пурпурный) разграничивают грудную и брюшную области; *Distal-less* (красный) соответствует расположению челюстей и началу конечностей. (Рис. А вверху по данным: M. Peifer et al., 1987. *Genes Dev* 1: 891–898; внизу по данным: S. D. Hueber et al., 2010. *PLOS ONE* 5: e10820/CC BY 4.0. doi:10.1371/journal.pone.0010820)

III (рис. 9.24). Первый регион, известный как **комплекс Antennapedia**, содержит гомеозисные гены: *labial* (*lab*), *Antennapedia* (*Antp*), *sex combs reduced* (*scr*), *deformed* (*dfd*) и *proboscipedia* (*pb*). Гены *labial* и *deformed* специфицируют сегменты головы, тогда как *sex combs reduced* и *Antennapedia* способствуют приобретению идентичности грудными сегментами. Ген *proboscipedia*, по-видимому, действует только у взрослых, но при его отсутствии губные щупики рта превращаются в ноги (Wakimoto et al., 1984; Kaufman et al., 1990; Maeda and Karch, 2009).

Вторая область гомеозисных генов — **комплекс bithorax** (Lewis, 1978; Maeda and Karch, 2009). В нем обнаружены три гена, кодирующие белки: *Ultrabithorax* (*Ubx*), необходимый для идентификации третьего грудного сегмента, и гены *Abdominal A* (*AbdA*) и *Abdominal B* (*AbdB*), отвечающие за идентичность сегментов брюшка (Sánchez-Herrero et al. 1985). Область хромосомы, которая содержит и комплекс Antennapedia, и комплекс bithorax, часто называют **гомеозисным комплексом** или **Hom-C**.

Поскольку гомеозисные селекторные гены отвечают за спецификацию частей тела мушки, мутации в них приводят к причудливым фенотипам. В 1894 г. Уильям Бейтсон назвал эти организмы **гомеозисными мутантами**, и они десятилетиями интересовали биологов развития. Например, тело нормальной взрослой мушки содержит три грудных сегмента, каждый из которых производит пару ног. Первый грудной сегмент не производит никаких других придатков, но второй грудной сегмент производит пару крыльев в дополнение к ногам. Третий грудной сегмент производит пару ног и пару балансиров, известных как **жужжальца**. У гомеозисных мутантов эти идентичности сегментов могут изменяться. Если удалить ген *Ultrabithorax*, третий грудной сегмент (несущий жужжальца) превращается еще в один второй грудной сегмент: появляется мушка с четырьмя крыльями (рис. 9.25) — необычная ситуация для классического двукрылого насекомого¹.

Точно так же белок Antennapedia обычно определяет второй грудной сегмент мушки. Но когда происходит мутация, при которой ген *Antennapedia* экспрессируется в голове (а также в груди), на голове вырастают не антенны, а ноги (рис. 9.26). Отчасти это происходит потому, что, в дополнение к стиму-

¹ Два режима сегментации могут потребоваться для координации движения взрослой мушки. У членистоногих ганглии вентрального нервного тяжа организованы парасегментами, а бороздки кутикулы и мускулатура сегментарны. Смещение на один компартмент позволяет одному и тому же ганглию координировать мышцы с обеих сторон любого конкретного эпидермального сегмента. Это, в свою очередь, обеспечивает быстрые и скоординированные сокращения мышц во время движения (Deutsch, 2004). Аналогичная ситуация возникает у позвоночных, у которых задняя часть одного сомита объединяется с передней частью следующего сомита.

лированию образования грудных структур, белок Antennapedia связывается и репрессирует энхансеры по меньшей мере двух генов, *homothorax* и *eyeless*, кодирующих факторы транскрипции, которые являются критическими для формирования антенны и глаза соответственно (Casares and Mann 1998; Plaza et al. 2001). Следовательно, одна из функций Antennapedia заключается в подавлении генов, которые запускают развитие антенн и глаз. У рецессивного мутанта по *Antennapedia* ген не экспрессируется во втором грудном сегменте, и на месте ног вырастают антенны (Struhl, 1981; Frischer et al., 1986; Schneuwly et al., 1987).

Основные гомеозисные селекторные гены были клонированы, их экспрессия проанализирована методом гибридизации *in situ* и было показано, что они кодируют гомеобоксодержащие факторы транскрипции (Harding et al., 1985; Akam, 1987). Транскрипты

каждого гена обнаруживаются в определенных областях эмбриона (см. рис. 9.24B) и особенно выделяются в центральной нервной системе.

Формирование дорсально-вентральной оси

Дорсально-вентральная разметка в ооците

По мере увеличения объема ооцита растущие микротрубочки выталкивают ядро в положение, которое становится дорсальным передним краем ооцита, — это событие является переломным нарушением симметрии (Zhao et al., 2012). Здесь транскрипт гена *gurken*, имеющий решающее значение при установлении передне-задней оси, инициирует формирование дорсально-вентральной оси. мРНК *gurken* располагается полумесяцем между ядром и клеточной мембраной ооцита, а его белковый продукт образует передне-задний градиент

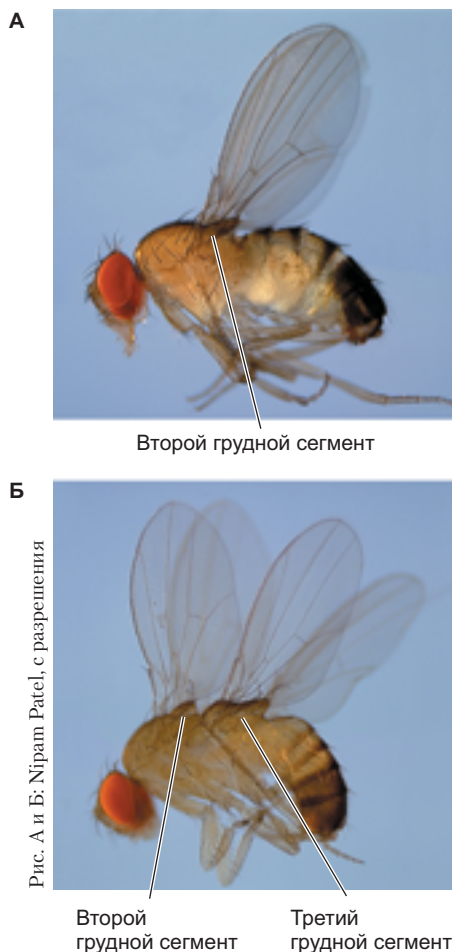


Рис. 9.25. А. Крылья плодовой мушки дикого типа формируются из второго грудного сегмента. Б. Четырехкрылая плодовая мушка, сконструированная путем объединения трех мутаций в *цис*-регуляторах гена *Ultrabithorax*. Мутации эффективно трансформируют третий грудной сегмент в дополнительный второй грудной сегмент (т. е. превращают жужжальца в крылья)

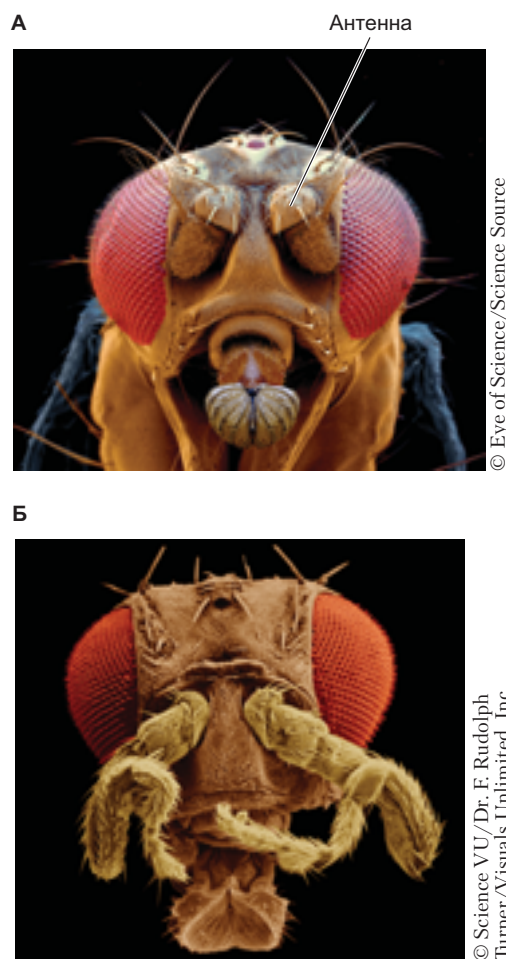


Рис. 9.26. А. Голова плодовой мушки дикого типа. Б. Голова мушки с мутацией в гене *Antennapedia*, превращающей антенны в ноги

вдоль дорсальной поверхности ооцита (рис. 9.27; Neuman-Silberberg and Schüpbach, 1993). Поскольку он может распространяться только на короткое расстояние, белок Gurken достигает только тех фолликулярных клеток, которые находятся ближе всего к ядру ооцита, и через рецептор Torpedo передает этим клеткам сигнал, заставляющий их стать столбчатыми дорсальными фолликулярными клетками (Montell et al., 1991; Schüpbach et al., 1991). Так в слое фолликулярных клеток, который окружает растущий ооцит, устанавливается дорсально-вентральная полярность.

Недостаток материнских генов *gurken* или *torpedo* вызывает вентрализацию эмбриона. Однако *gurken* активен только в ооците, а *torpedo* — только в соматических фолликулярных клетках (Schüpbach, 1987). Сигнал Gurken-Torpedo, специфицирующий дорсализованные фолликулярные клетки, инициирует каскад активности генов, который создает дорсально-вентральную ось эмбриона.

Формирование дорсально-вентральной оси в эмбрионе

Белок, обособляющий dorsum (спина) от ventrum (брюхо) в мушиных эмбрионах, является продуктом гена *dorsal*. Фактор транскрипции белок Dor-

sal активирует гены, которые формируют брюшные структуры. (Обратите внимание, что это еще один ген *Drosophila*, названный в честь его мутантного фенотипа: продукт гена *dorsal* представляет собой морфоген, вентрализирующий область, в которой он присутствует.) мРНК-транскрипт материнского гена *dorsal* откладывается в ооците питающими клетками. Однако белок Dorsal не синтезируется из этой материнской мРНК в течение примерно 90 мин после оплодотворения. Когда Dorsal транслируется, его можно обнаружить во всем зародыше, а не только в вентральной или дорсальной части. Как же этот белок может действовать в качестве морфогена, если он распределен в зародыше равномерно?

Ответ на этот вопрос был неожиданным (Roth et al., 1989; Rushlow et al., 1989; Steward, 1989). Хотя белок Dorsal обнаруживают во всей синцитиальной бластодерме раннего эмбриона *Drosophila*, он транслируется в ядра только в вентральной части эмбриона. В ядре Dorsal действует как фактор транскрипции, связываясь с определенными генами, активируя или репрессируя их транскрипцию. Если Dorsal не входит в ядро, гены, ответственные за спецификацию вентральных клеток, не транскрибируются, а гены, ответственные за спецификацию дорсальных клеток, не репрессируются, и все клетки эмбриона специфицируются как дорсальные.

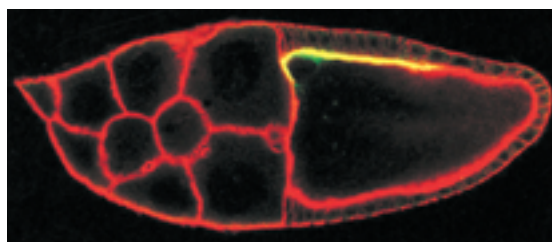
Модель формирования дорсально-вентральной оси у *Drosophila* подтверждает анализ эффекта мутаций, которые приводят к полностью дорсализованному или полностью вентрализованному фенотипу, когда у личинки нет «спины» и она вскоре умирает (Anderson and Nüsslein-Volhard, 1984). У полностью дорсализованных мутантов (о чем свидетельствует их дорсально-специфический экзоскелет) Dorsal не проникает в ядра никаких клеток. Наоборот, у полностью вентрализованных мутантов белок Dorsal обнаруживают в каждом клеточном ядре (рис. 9.28А).

А



Из: R. P. Ray and T. Schüpbach, 1996. *Genes Dev* 10: 1711–1723, с разрешения T. Schüpbach

Б



С разрешения: C. van Buskirk и T. Schüpbach

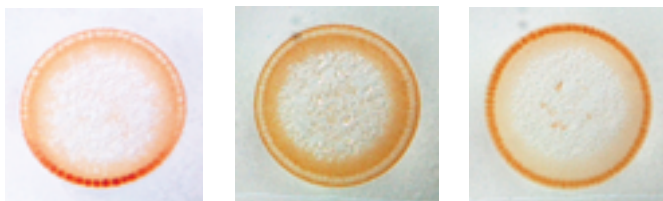
Рис. 9.27. Экспрессия Gurken между ядром и дорсальной передней клеточной мембраной ооцита. **А.** мРНК *gurken* локализуется между ядром ооцита и дорсальными фолликулярными клетками яичника. Передний конец находится слева, дорсальная сторона —верху. **Б.** В более зрелом ооците белок Gurken (желтый) локализуется в дорсальной области. Границы клеток визуализированы окрашиванием актина в красный цвет. По мере роста ооцита фолликулярные клетки мигрируют через вершину ооцита и подвергаются воздействию Gurken

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

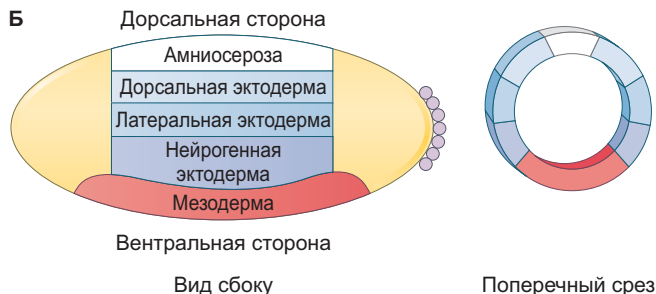
Установление ядерного градиента Dorsal

Как же белок Dorsal попадает в ядра только вентральных клеток? Когда Dorsal впервые продуцируется, он образует в цитоплазме синцитиальной бластодермы комплекс с белком Cactus. Пока Cactus связан с ним, Dorsal остается в цитоплазме. Dorsal проникает в вентральные ядра в ответ на сигналы, которые освобождают его от белка Cactus. Такое отделение Dorsal от Cactus инициирует вентральная активация toll-рецептора. Когда Spätzle связывается и активирует белок Toll, Toll активирует протеинкиназу, называемую Pelle. Другой белок Tube, вероятно, необходим для доставки

А

Из: S. Roth et al., 1989. *Cell* 59: 1189–1202, с разрешения

Б



В

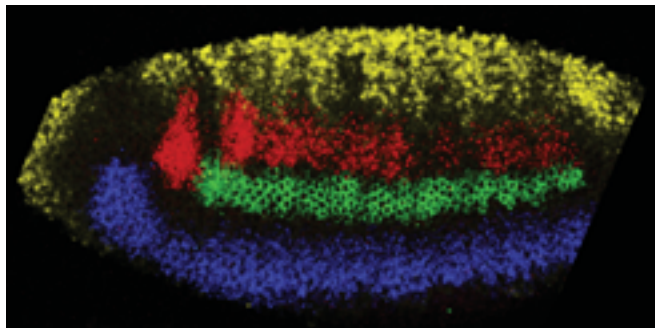
Из: D. Kosman et al., 2004. *Science* 305: 846, с разрешения D. Kosman и E. Bier

Рис. 9.28 Спецификация клеток белком Dorsal. **А.** Поперечные срезы эмбрионов, окрашенных антителами против белка Dorsal (*темное окрашивание*). Эмбрион дикого типа (*слева*) имеет белок Dorsal только в самых вентральных ядрах. Дорсализованный мутант (*в центре*) не имеет ядерной локализации белка Dorsal. У вентрализованного мутанта (*справа*) дорсальный белок можно обнаружить в ядрах всех клеток. **Б.** Карта презумптивных зачатков эмбриона *Drosophila* на 14-м цикле деления дробления. Вентральная область становится мезодермой; следующие, более латеральные области становятся нейрогенной (вентральной) эктодермой, латеральной и дорсальной эктодермой, которые различаются по кутикуле. Дорсальная область эмбриона становится амниосерозой — внезародышевой оболочкой, окружающей эмбрион. Транслокация белка Dorsal в вентральные, но не латеральные или дорсальные ядра создает градиент, благодаря которому вентральные клетки с наибольшим количеством белка Dorsal становятся предшественниками мезодермы. **В.** Дорсально-вентральная разметка тела *Drosophila*. После инвагинации мезодермы эффекты градиента Dorsal можно увидеть в туловищной области этого окрашенного эмбриона. Наиболее вентральный ген *ventral nervous system defective* (*синий*) экспрессируется в нейрогенной эктодерме. Ген *intermediate neuroblast defective* (*зеленый*) экспрессируется в латеральной эктодерме. *Красным* цветом обозначена экспрессия гена *muscle-specific homeobox* в мезодерме над промежуточными нейробластами. Самая дорсальная ткань экспрессирует ген *decapentaplegic* (*желтый*). (Рис. Б по данным: С. А. Rushlow et al., 1989. *Cell* 59: 1165–1177.)

Pelle к клеточной мембране, где он может быть активирован (Galindo et al., 1995). Активированная протеинкиназа Pelle (возможно, через посредника) может фосфорилировать Cactus. После фосфорилирования Cactus деградирует, и Dorsal может проникать в ядро (Kidd, 1992; Shelton and Wasserman, 1993; Whalen and Steward, 1993; Reach et al., 1996). Так как Toll активируется градиентом белка Spätzle, наивысшим в вентральной области, существует соответствующий градиент транслокации Dorsal в вентральных клетках эмбриона, с наиболее высокими концентрациями Dorsal в ядрах самых вентральных клеток, которые становятся мезодермой (рис. 9.28Б).

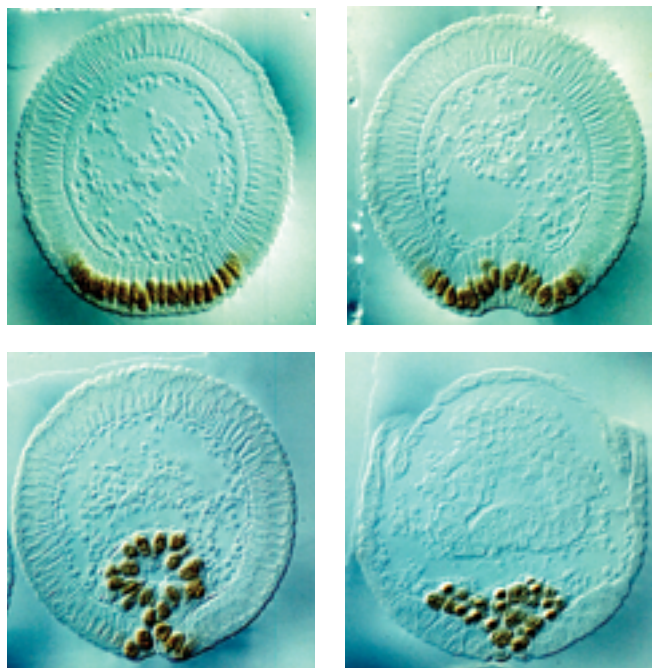
Белок Dorsal сигнализирует о первом морфогенетическом событии гаструляции *Drosophila*. 16 более вентральных клеток зародыша — те клетки, которые содержат наибольшее количество Dorsal в ядрах, — инвагинируют и формируют мезодерму (рис. 9.29). Все мышцы тела, жировые тела

и половые железы происходят из этих мезодермальных клеток (Фое, 1989). Клетки, которые займут положение по вентральной средней линии, станут нервами и глией.

Оси и зачатки органов: модель в картезианских координатах

Передне-задняя и дорсально-вентральная оси эмбрионов *Drosophila* образуют систему координат, которую можно использовать для определения положения внутри эмбриона (рис. 9.30А). Теоретически, исходно эквивалентные в потенциале развития клетки могут экспрессировать различные наборы генов в зависимости от своего положения. Этот тип спецификации был продемонстрирован при формировании зачатков слюнных желез (Panzer et al., 1992; Bradley et al., 2001; Zhou et al., 2001).

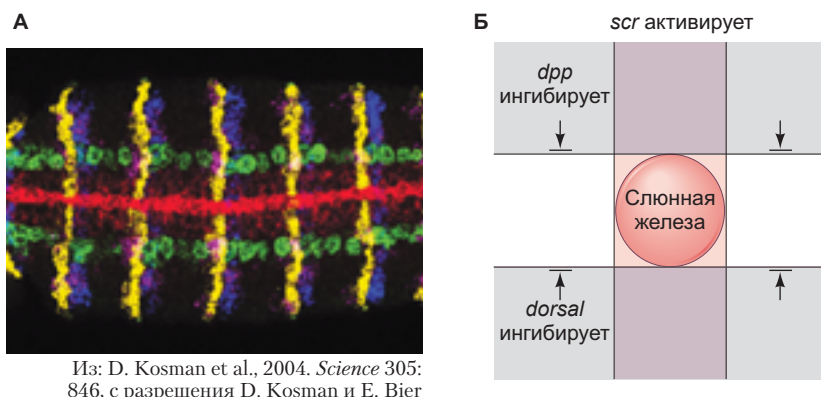
Рис. 9.29. Гастрюляция у *Drosophila*. На поперечных срезах видно, как мезодермальные клетки в вентральной части эмбриона вворачиваются и образуют вентральную бороздку (см. рис. 9.7А, Б). Бороздка становится трубкой, которая углубляется в эмбрион, а затем уплощается и формирует мезодермальные органы. Ядра окрашены антителами к мезодермальному маркеру — белку Twist. (Из: M. Leptin, 1991. В: *Gastrulation: Movements, Patterns, and Molecules*, R. Keller, et al. (Eds.), pp. 199–212. Plenum: New York, с разрешения M. Leptin)



Слюнные железы *Drosophila* образуются только в полосе клеток, определяемой вдоль передне-задней оси активностью гена *sex combs reduced* (*scr*) (парасегмент 2). У мутантов, дефицитных по *scr*, слюнные железы не образуются. Более того, если *scr* искусственно экспрессировать во всем эмбрионе, зачатки слюнных желез образуются в вентролатеральной полосе на большей части длины эмбриона. Формирование слюнных желез вдоль дорсально-вентральной оси подавляют белки *Decapentaplegic* и *Dorsal*, ингибирующие закладку слюнных желез

дорсально и вентрально соответственно. Таким образом, слюнные железы образуются на пересечении вертикальной полосы экспрессии *scr* (парасегмент 2) и горизонтальной области в середине окружности эмбриона, которая свободна и от *Decapentaplegic*, и от *Dorsal* (рис. 9.30Б). Клетки, образующие слюнные железы, определяются посредством пересекающихся активностей генов вдоль передне-задней и дорсально-вентральной осей.

Аналогичную ситуацию можно наблюдать в клетках-предшественниках нервной системы, об-



Из: D. Kosman et al., 2004. *Science* 305: 846, с разрешения D. Kosman и E. Bier

Рис. 9.30. Картезианская (Декартова) система координат, построенная на основе паттернов экспрессии генов. **А.** Сетка (вид на вентральную поверхность эмбриона), образованная экспрессией мРНК генов *short-gastrulation* (красный), *intermediate neuroblast defective* (зеленый) и *muscle segment homeobox* (пурпурный) вдоль дорсально-вентральной оси, и генов *wingless* (желтый) и *engrailed* (фиолетовый) вдоль передне-задней оси. **Б.** Координаты экспрессии генов, дающие начало слюнным железам *Drosophila*. Эти гены активирует белковый продукт гомеозисного гена *sex combs reduced* (*scr*) в узкой полосе вдоль передне-задней оси. Их ингибирование происходит в областях экспрессии продуктов генов *decapentaplegic* (*dpp*) и *dorsal* вдоль дорсально-вентральной оси. Такой паттерн позволяет слюнным железам формироваться по средней линии второго парасегмента зародыша. (Рис. Б по данным: S. Panzer et al., 1992. *Development* 114: 49–57.)

наруженных в каждом сегменте *Drosophila*. Нейробласты возникают из 10 кластеров по четыре–шесть клеток в каждом, которые образуются на отдельной стороне каждого сегмента в полоске нейроэктодермы по средней линии эмбриона (Skeath and Carroll, 1992). Клетки в каждом кластере взаимодействуют (через путь Notch, см. гл. 4) и генерируют одну нервную клетку в каждом кластере. Скейт и коллеги (1992) показали, что паттерн транскрипции нейронных генов определяется системой координат.

Их экспрессию репрессируют вдоль дорсально-вентральной оси белки Decapentaplegic и Snail, в то время как положительное усиление генами парного правила вдоль передне-задней оси вызывает повторение нейронных генов в каждом полусегменте. Таким образом, весьма вероятно, что положение зачатков органов у мушки определяется с помощью двумерной системы координат, основанной на пересечении передне-задней и дорсально-вентральной осей.



С разрешения: Nipam Patel

О фотографии в начале главы

У плодовой мушки унаследованные гены продуцируют белки, которые взаимодействуют и определяют нормальную ориентацию тела: с головой на одном конце и хвостом на другом. Эти взаимодействия приводят к спецификации целых блоков тела мушки как модульных единиц. Полосатый узор гомеозисных белков специфицирует структуры, которые должны быть сформированы во всех сегментах взрослой мушки. Мутации в генах этих белков, называемые гомеозисными мутациями, *могут привести к появлению крыльев там, где должны быть жужжальца*, или ног на месте антенны. Примечательно, что проксимально-дистальная ориентация мутантных придатков соответствует проксимально-дистальной оси исходного придатка, это указывает на то, что придатки следуют аналогичным правилам удлинения. Теперь мы знаем, что многие мутации, влияющие на сегментацию взрослой мушки, на самом деле воздействуют на эмбриональную модульную единицу, парасегмент. Следует помнить, что как у беспозвоночных, так и у позвоночных, единицы конструкции эмбриона часто не совпадают с единицами, которые мы видим во взрослом организме.



Коротко

Генетика спецификации осей у *Drosophila*

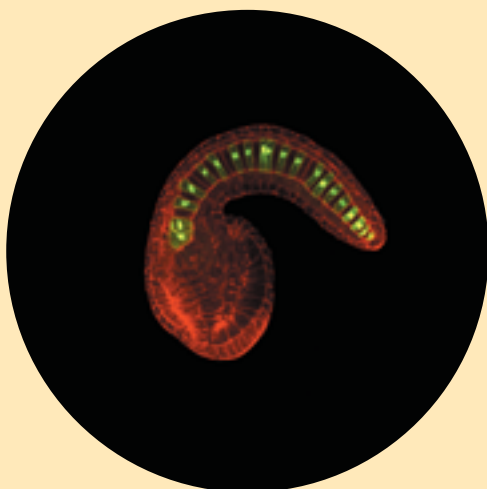
1. Дробление у *Drosophila* является поверхностным. Перед тем как компартментализоваться, ядра делятся 13 раз. До образования клеток они находятся в синцитиальной бластодерме. Каждое ядро окружено богатой актином цитоплазмой.
2. Когда вокруг ядер образуются клеточные мембраны, эмбрион у *Drosophila* подвергается переходу по средней бласте, при котором деления дробления становятся асинхронными и синтезируется новая мРНК. В это время происходит переход от материнского к зиготическому контролю развития.
3. Гастрюляция начинается с инвагинации самой вентральной области (презумптивной мезодермы), которая включает образование вентральной бороздки. Зародышевая полоска растягивается так, что будущие задние сегменты оказываются прямо за презумптивной головой.
4. Гены, регулирующие формирование разметки тела *Drosophila*, действуют в соответствии с определенными принципами:
 - Существуют *морфогены*, такие как Bicoid и Dorsal, градиенты которых детерминируют спецификацию различных типов клеток. У синцитиальных эмбрионов морфогены могут быть факторами транскрипции.
 - *Границы* экспрессии генов могут быть обусловлены взаимодействием факторов транскрипции и их генов-мишеней. Транскрипционные факторы, транскрибированные раньше, регулируют экспрессию следующего набора генов.
 - *Контроль трансляции* чрезвычайно важен для ранних эмбрионов, а локализация мРНК имеет решающее значение для разметки эмбриона.

- *Идентичность клеток* определяется не сразу. Существует пошаговая спецификация, в которой определенное поле разделяется и подразделяется, что в конечном счете регулирует пути развития отдельных клеток.
5. Существует временной порядок, согласно которому транскрибируются различные классы генов, и продукты одного гена часто регулируют экспрессию другого гена.
 6. Гены материнского эффекта ответственны за инициацию передне-задней полярности. мРНК *bicoid* связывается своим 3'-UTR с цитоскелетом на будущем переднем полюсе; локализация мРНК *nanos* ограничена ее 3'-UTR будущим задним полюсом; транскрипты *hunchback* и *caudal* распределяются по всему эмбриону.
 7. Белки Bicoid и Hunchback активируют гены, ответственные за переднюю часть тела мушки; Caudal активирует гены, ответственные за заднюю часть.
 8. Несегментированные передние и задние оконечности регулирует активация белка Torso на переднем и заднем полюсах яйца.
 9. Gap-гены реагируют на концентрацию белков генов материнского эффекта. Их белковые продукты взаимодействуют друг с другом таким образом, что каждый белок gap-гена специфицирует определенные области эмбриона.
 10. Белки gap-генов активируют и репрессируют гены pair rule. Гены pair rule имеют модульные энхансеры, определяющие их активирование в семи полосах. Границы их транскрипции определяют gap-гены.
- Гены pair rule образуют семь полос транскрипции вдоль передне-задней оси, каждая из которых содержит два парасегмента.
11. Продукты генов pair rule активируют экспрессию генов сегментной полярности *engrailed* и *wingless* в соседних клетках. Клетки, экспрессирующие *engrailed*, образуют переднюю границу каждого парасегмента, а также сигнальный центр, который организует формирование кутикулы и сегментарной структуры эмбриона.
 12. Гомеозисные селекторные гены обнаружены в двух комплексах на III хромосоме *Drosophila*. Вместе эти регионы называют гомеозисным генным комплексом Hom-C. Гены расположены в том же порядке, что и паттерны их транскрипции. Они специфицируют отдельные сегменты, и мутации в них способны трансформировать один сегмент в другой.
 13. Дорсально-вентральная полярность иницируется, когда ядро перемещается к передней дорсальной части ооцита и ограничивает локализацию транскрипта *gurken*, позволяя ему транслироваться на дорсальной стороне яйца.
 14. Активность белка Dorsal проявляется, когда он входит в ядро, за счет чего формируется градиент активности. Ядра, занимающие самое вентральное положение, содержат наибольшую концентрацию белка Dorsal и становятся мезодермой; более латеральные ядра становятся нейрогенной эктодермой.
 15. Органы образуются на пересечении дорсально-вентральной и передне-задней областей экспрессии генов.

Морские ежи и асцидии: вторичноротые беспозвоночные



Как флуоресцирующие клетки
этого зародыша асцидии
заявляют о своем родстве с вами?



С разрешения: Anna Di Gregorio

Описав раннее развитие представителей трех групп первичноротых — моллюсков, круглых червей и насекомых, — теперь обратимся к вторичноротым. Число видов вторичноротых гораздо меньше, чем первичноротых, но к ним относят все группы позвоночных животных — рыб, земноводных, пресмыкающихся, птиц и млекопитающих. Несколько групп беспозвоночных тоже следуют паттерну развития вторичноротых (в котором бластопор становится анусом во время гастрюляции). К ним принадлежат полухордовые (желудевые черви), головохордовые (ланцетник), иглокожие (морские ежи, морские звезды, морские огурцы и др.) и урохордаты, или оболочники (прежде всего асцидии, известные также как морские спринцовки) (**рис. 10.1**). Данная глава посвящена раннему развитию иглокожих (преимущественно морских ежей) и оболочников (преимущественно асцидий), которые были предметом принципиально важных исследований в биологии развития.

Действительно, обусловленная спецификация (в прошлом, но не сегодня, называемая также «регуляционным развитием») была впервые обнаружена у морских ежей, а на оболочниках получены первые свидетельства автономной спецификации («мозаичное развитие»; см. гл. 2). Как мы увидим далее, на самом деле обе группы используют оба режима спецификации.

Раннее развитие морских ежей

Морские ежи стали исключительно важными объектами изучения того, как гены регулируют формирование организма. Ханс Дриш, изучая морских ежей, открыл регулятивное развитие. Он обнаружил, что один бластомер, выделенный из четырехклеточного

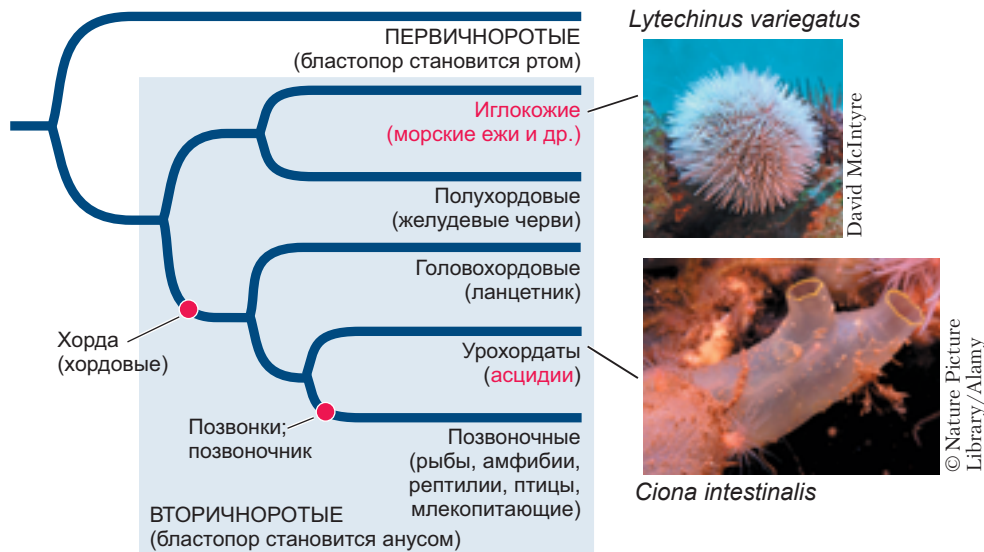


Рис. 10.1. Иглокожие и оболочники являются представителями вторичноротых беспозвоночных. Оболочники принадлежат также к типу Хордовые, потому что их личинки имеют хорду (нотохорд), дорсальную нервную трубку и жаберные дуги. Оболочников называют урохордатами (от др.-греч. οὐρά — хвост и χορδή — струна, хорда), потому что хорда расположена только в хвосте личинки. Зеленый морской еж (*Lytechinus variegatus*) и асцидия *Ciona intestinalis* — два широко изученных модельных организма (красный шрифт и сопровождающие фотографии)

эмбриона, может образовать целую личинку морского ежа (плутеус), а значит, ранние стадии развития морского ежа обладают регулятивным режимом (Driesch, 1891; см. также гл. 2). Однако бластомеры, выделенные на более поздних стадиях, уже не могут стать всеми клетками тела личинки, следовательно, в определенный момент созревания клетки принимают свой путь развития.

На эмбрионах морского ежа были получены первые результаты, свидетельствующие о том, что для развития необходимы хромосомы, что ДНК и РНК присутствуют в каждой клетке животного, что матричные РНК направляют синтез белка, что информационные, или мРНК, обеспечивают синтез белков для раннего эмбрионального развития, что циклины контролируют деление клеток и что энхансеры являются модульными (Ernst, 2011; McClay, 2011). Впервые клонированный эукариотический ген кодировал белок гистона морского ежа (Kedes et al., 1975), а первое доказательство ремоделирования хроматина касалось изменения гистонов в ходе его эмбрионального развития (Newrock et al., 1978). С появлением новых генетических методов эмбрионы морских ежей продолжают оставаться крайне важными объектами для исследования механизмов, посредством которых генетические взаимодействия определяют спецификацию клеточных судеб.

Раннее дробление

У морских ежей **радиальное голобластическое дробление** (рис. 10.2 и 10.3). Вспомните из гл. 1, что

таким образом дробятся яйцеклетки с небольшим количеством желтка и что борозды голобластического дробления проходят через все яйцо (см. рис. 1.9). Первые семь делений дробления морских ежей стереотипны, т. е. у каждой особи одного и того же вида можно наблюдать одинаковую картину. Первое и второе деления дробления меридиональны и перпендикулярны друг другу (т. е. борозды дробления проходят через анимальный и вегетативный полюса). Третье деление дробления является экваториальным, проходит перпендикулярно первым двум плоскостям дробления и отделяет анимальное и вегетативное полушария друг от друга (рис. 10.2А, *верхний ряд* и рис. 10.3А–В). Однако четвертое деление дробления отличается от первых трех. Четыре клетки анимального яруса делятся меридионально на восемь одинаковых бластомеров, которые называют **мезомерами**. При этом вегетативный ярус делится экваториально и неравномерно (рис. 10.2В), в результате чего образуются четыре крупные клетки **макромеры** и четыре маленьких **микромера** на вегетативном полюсе.

У часто используемого для экспериментов морского ежа *Lytechinus variegatus* соотношение цитоплазмы, содержащейся в макромерах, и цитоплазмы микромера составляет 95 : 5. По мере того как 16-клеточный эмбрион дробится, восемь «анимальных» мезомеров делятся экваториально, образуя два яруса бластомеров ap_1 и ap_2 , располагающихся один над другим. Макромеры делятся меридионально, образуя ярус из восьми клеток под ap_2 (рис. 10.2А, *нижний ряд*). Несколько позже микромера делятся неравномерно и образуют кластер из четырех малень-

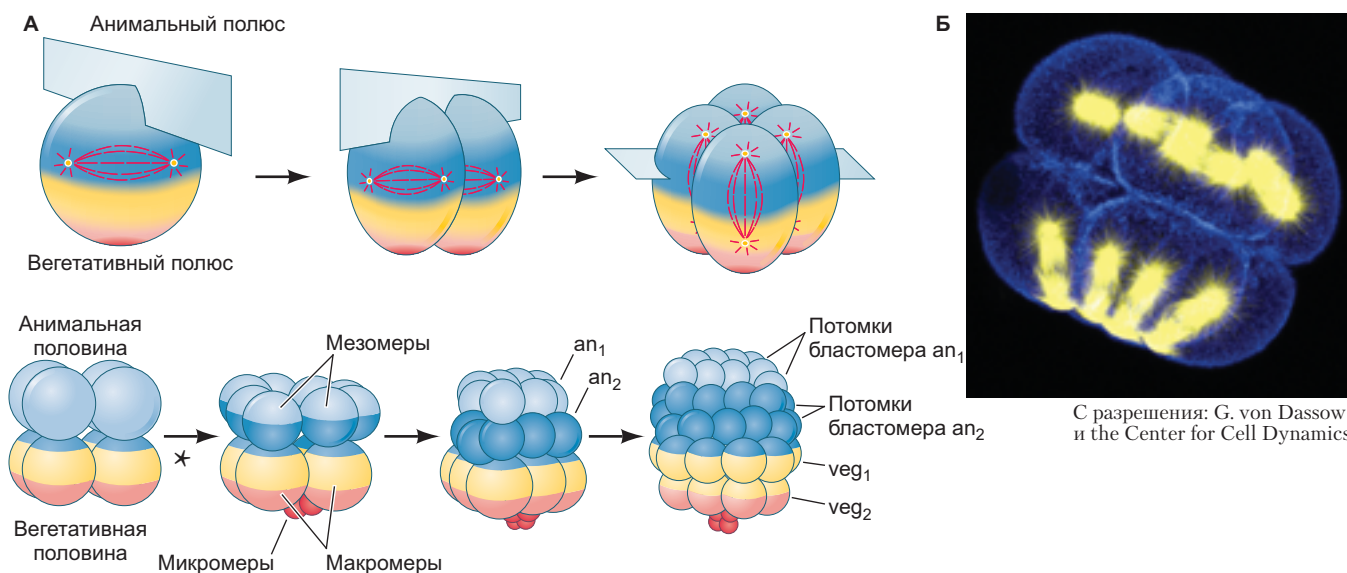


Рис. 10.2. Дробление морского ежа. **А.** Плоскости первых трех делений дробления и образование ярусов клеток в результате третьего — шестого делений дробления. **Б.** Конфокальная флуоресцентная микрофотография неравномерного четвертого деления дробления, в результате которого образуется 16-клеточный эмбрион (звездочка на рис. А). Обратите внимание на неравномерное экваториальное дробление вегетативных blastomeres с образованием микромеров и макромеров. (Рис. А по данным: J. W. Saunders, Jr., 1982. *Developmental Biology: Patterns, Problems, and Principles*. Macmillan: New York.)

ких микромеров, располагающихся на вегетативном полюсе, под ярусом из четырех больших микромеров. Маленькие микромеры делятся еще раз, а затем прекращают делиться до личиночной стадии. При шестом делении клетки анимального полушария делятся в меридиональном направлении, а вегетативно-

го — в экваториальном (рис. 10.2А, нижний ряд); при седьмом делении — наоборот. В это время эмбрион представляет собой бластулу, 120 клеток которой образуют полую сферу, окружающую центральную полость под названием **бластоцель** (рис. 10.3Г). С этого момента деления становятся менее упорядоченными.

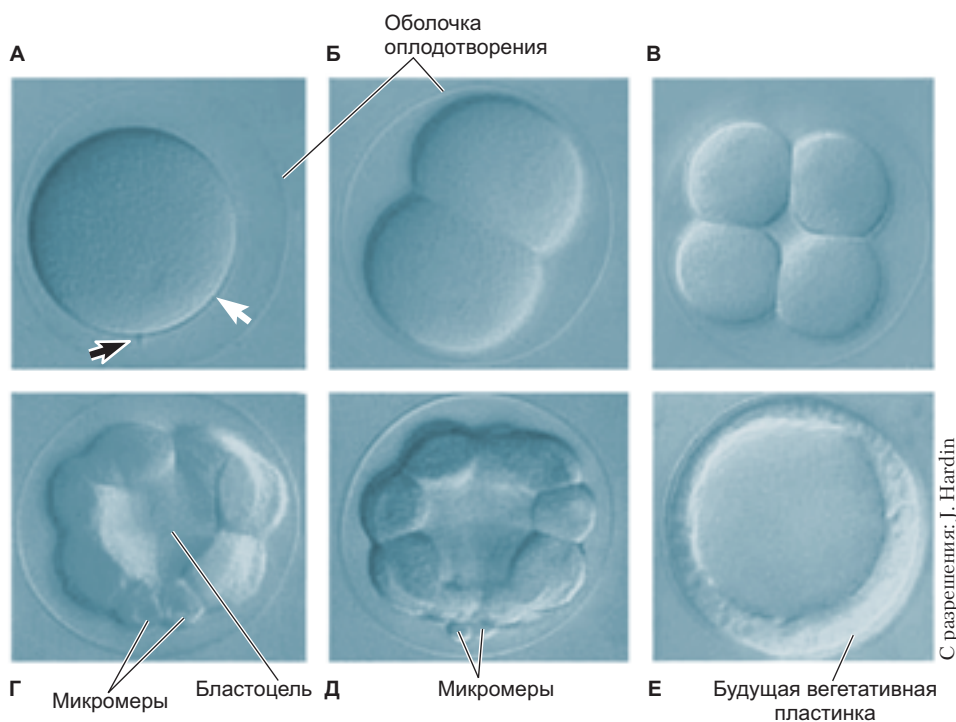


Рис. 10.3. Прижизненные микрофотографии дробления эмбрионов морского ежа *Lytechinus variegatus* (вид сбоку). **А.** Одноклеточный эмбрион (зигота). Место входа сперматозоида отмечено черной стрелкой; белая стрелка обозначает вегетативный полюс. Хорошо видна оболочка оплодотворения, окружающая зародыш. **Б.** Двухклеточная стадия. **В.** Восьмиклеточная стадия. **Г.** 16-клеточная стадия. На вегетативном полюсе образовались микромеры. **Д.** 32-клеточная стадия. **Е.** Бластула вылупилась из оболочки оплодотворения. Вегетативная пластинка начинает утолщаться

Как мы обсудим далее, повторяющиеся асимметричные деления позволяют применить стратегию спецификации клеток за счет неравномерного распределения материнских цитоплазматических детерминант при каждом митотическом делении.

Формирование бластулы

К стадии бластулы микромеры замедляют клеточные деления и все бластомеры становятся одного размера. Каждая клетка контактирует изнутри с белковой жидкостью бластоцеля, а снаружи — с гиалиновым слоем. Плотные контакты объединяют прежде слабо связанные бластомеры в гладкий эпителиальный слой, который полностью окружает бластоцель. По мере продолжения деления клеток бластула остается однослойной, при этом становится более тонкостенной и увеличивается в объеме. Этому способствует адгезия бластомеров к гиалиновому слою и приток в бластоцель воды, которая растягивает его (Dan, 1960; Wolpert and Gustafson, 1961; Ettensohn and Ingersoll, 1992).

Быстрые равномерные клеточные деления длятся до девятого или десятого деления дробления, в зависимости от вида. К этому времени будущее бластомеров уже предопределено (см. часть III). Каждая клетка приобретает ресничку в наиболее удаленной от бластоцеля области клеточной мембраны. Таким образом, в каждой эмбриональной клетке уже есть апикально-базальная (внешне-внутренняя) полярность, и, по некоторым данным, как и у нематод, в разметке базальных клеточных мембран участвуют PAR-белки (Alford et al., 2009). Ресничная бластула начинает вращаться внутри оболочки оплодотворения. Вскоре после этого становятся заметны различия между бластомерами. Клетки на вегетативном полюсе бластулы начинают утолщаться и формируют **вегетативную пластинку** (рис. 10.3Е). Клетки анимального полушария синтезируют и секретируют фермент вылупления, который растворяет оболочку оплодотворения (Lepage et al., 1992). Эмбрион с этого момента становится свободноплавающей **вылупившейся бластулой**.

Карты презумптивных зачатков и детерминация бластомеров морского ежа

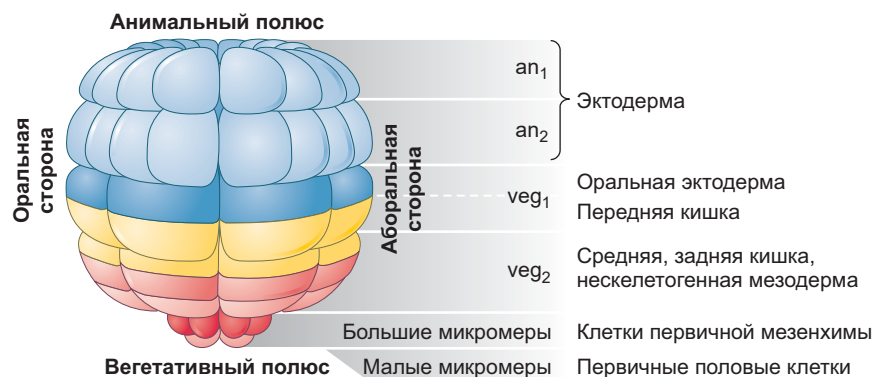
В первых картах презумптивных судеб эмбриона морского ежа были прослежены потомки каждого из бластомеров 16-клеточного зародыша. Карты были уточнены в новых исследованиях с помощью инъекций флуоресцентных красителей для маркировки отдельных клеток и их потомков. Результаты показали, что к 60-клеточной стадии пути развития большинства эмбриональных клеток уже предопределены, но клетки коммитированы обратимо (**рис. 10.4**). Другими словами, определенные бластомеры образуют одни и те же типы клеток в каждом эмбрионе, но эти клетки остаются плюрипотентными и могут дать начало другим типам клеток, если будут экспериментально помещены в другую часть эмбриона.

Анимальная половина зародыша всегда дает начало эктодерме — покровам личинки и ее нейронам (рис. 10.4). Слой veg_1 дает начало клеткам, способным входить в состав эктодермальных или энтодермальных органов личинки. Слой veg_2 образует клетки, которые могут заселять три различные структуры — энтодерму, целом (внутреннюю мезодермальную стенку тела) и **нескелетогенную мезенхиму** (иногда называемую **вторичной мезенхимой**), дающую начало пигментным клеткам, иммунцитам и мышечным клеткам. Верхний ярус микромеров (большие микромеры) образуют **скелетогенную мезенхиму** (также называемую **первичной мезенхимой**), которая формирует личиночный скелет. Микромеры нижнего яруса (малые микромеры) входят в состав личиночного целома, из которого во время метаморфоза формируются ткани взрослого морского ежа (Logan and McClay, 1997, 1999; Wray, 1999). Малые микромеры дают также начало клеткам зародышевой линии (Yajima and Wessel, 2011).

Детерминация судеб разных клеточных слоев происходит в два этапа.

1. В отличие от большинства клеток 16-клеточного эмбриона, крупные микромеры специфицируются **автономно**. Они наследуют материнские детерминанты, хранящиеся на вегетативном по-

Рис. 10.4. Карта зачатков и генеалогия клеток морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus*. Показан 60-клеточный эмбрион, обращенный левой стороной к наблюдателю. Судьбы бластомеров определяются положением вдоль анимально-вегетативной оси яйца



люсе яйца, и попадают в большие микромеры при четвертом делении дробления. В результате эти четыре микромера становятся клетками скелетогенной мезенхимы, которые выселяются из эпителия бластулы, попадают в бластоцель, мигрируют в определенные места вдоль стенки бластоцели, а затем дифференцируются в личиночный скелет. Даже если выделить микромеры из 16-клеточного эмбриона и поместить в чашку Петри, они поделаются соответствующее число раз и сформируют спикулы скелета, тем самым демонстрируя, что им не нужны никакие внешние сигналы для реализации своего скелетогенного потенциала (Okazaki, 1975). Так асимметрия дробления может приводить к молекулярной асимметрии и различающимся потенциалом развития.

- Автономно специфицированные большие микромеры теперь способны производить паракринные и юстакринные факторы, которые обусловленно специфицируют развитие их соседей. Эти факторы передают клеткам выше микромеров команду стать эндомезодермой (энтодермой и нескелетогенной вторичной мезенхимой) и инвагинировать внутрь эмбриона. Индуцирующая способность настолько выражена, что, если микромеры выделить из эмбриона и поместить в контакт с изолированной **анимальной шапочкой**, в норме дающей начало эктодерме, из клеток анимальной шапочки формируется энтодерма и развивается более или менее нормальная личинка (рис. 10.5; Hörstadius, 1939). Кроме того, если скелетогенные микромеры трансплантировать в анимальную область бластулы, то трансплантированные микромеры не только образуют скелетные спикулы, но и изменят статус близлежащих клеток эктодермы,

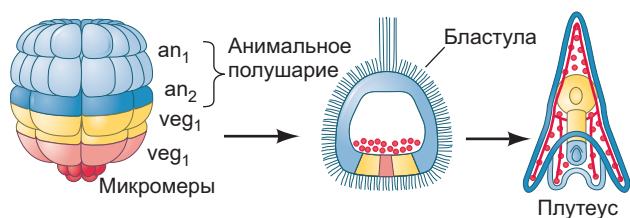
индуцируя их к переспецификации в энтодерму, образованию дополнительной области гастрულიи и формированию второй кишки (рис. 10.6; Hörstadius, 1973; Ransick and Davidson, 1993).

Генные регуляторные сети и спецификация скелетогенной мезенхимы

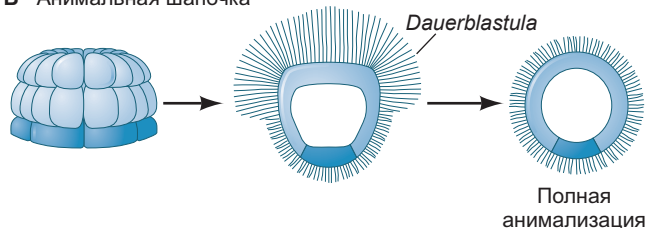
Согласно эмбриологу Э. Б. Вильсону, наследственность — это передача определенного паттерна развития из поколения в поколение, а эволюция — наследственное изменение такого плана. Еще в 1895 г. Уилсон писал в своей работе о развитии морского ежа, что инструкции по развитию каким-то образом хранятся в хромосомной ДНК и передаются хромосомами при оплодотворении. Однако у него не было никакой возможности узнать, как именно хромосомная информация переводится в инструкции по формированию эмбриона.

Сообщество биологов развития, изучающих морских ежей, сегодня озадачено тем, как ДНК участвует в управлении морфогенезом морских ежей (McClay, 2016). Группа Э. Дэвидсона трудится над расшифровкой сети, элементы логической схемы которой включают *цис*-регуляторные элементы (например, промоторы и энхансеры) и связаны друг с другом факторами транскрипции (см. рис. 3.7; Davidson and Levine, 2008; Oliveri et al., 2008; Peter and Davidson, 2015). Данная сеть получает свои первые входные данные от транскрипционных факторов цитоплазмы яйцеклетки. Она самоорганизуется за счет: 1) способности материнских факторов транскрипции рас-

А Нормальное развитие



Б Анимальная шапочка



В Анимальная шапочка и микромеры

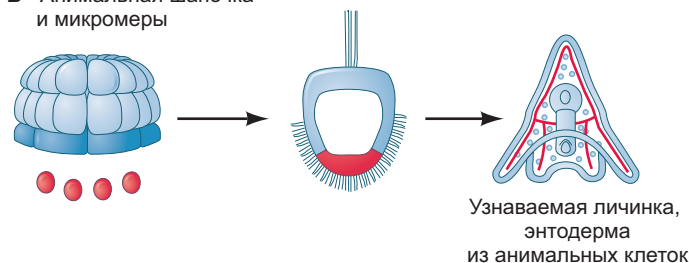
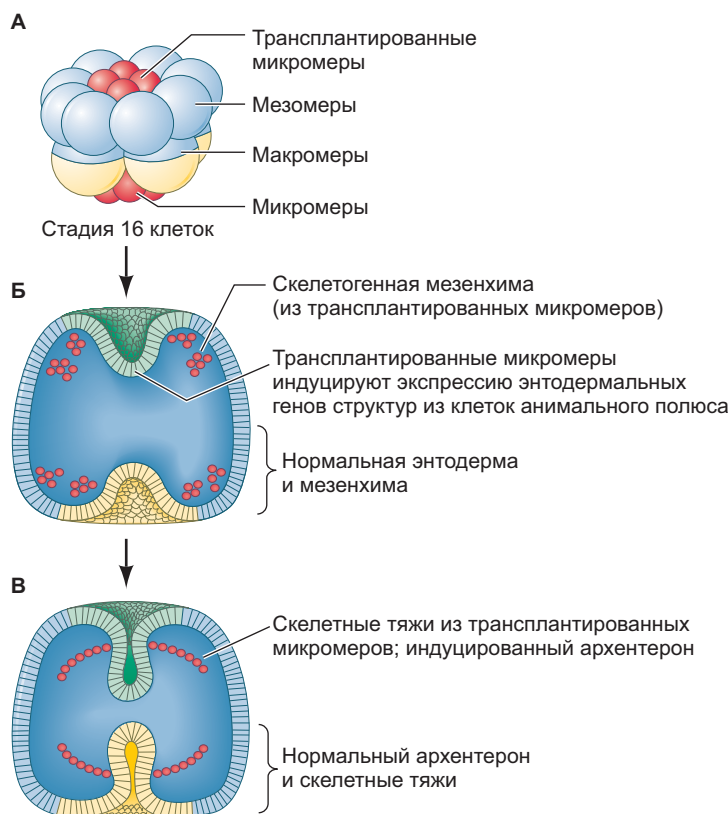


Рис. 10.5. Способность микромеров индуцировать презумптивные эктодермальные клетки к изменению их статуса. **А.** Нормальное развитие 60-клеточного зародыша морского ежа, демонстрирующее идентичность разных слоев клеток. **Б.** Изолированное анимальное полушарие (анимальная шапочка) развивается в ресничный шар из недифференцированных эктодермальных клеток, который называют *Dauerblastula* (стоячая бластула). **В.** Если изолированное анимальное полушарие объединить с изолированными микромерами, то образуется узнаваемая личинка плутеус с энтодермой, сформированной из анимального полушария. (По данным: S. Hörstadius, 1939. *Biol Rev* 14: 132–179.)



познавать *цис*-регуляторные элементы определенных генов, которые кодируют другие транскрипционные факторы; 2) способности нового набора транскрипционных факторов активировать паракринные сигнальные пути, которые активируют специфические факторы транскрипции в соседних клетках. Такие сети взаимосвязей генов, определяющих спецификацию типов клеток, называют **генными регуляторными сетями**.

Мы сосредоточимся на одной такой генной регуляторной сети, участвующей в определении пути развития клеток скелетогенной мезенхимы и приобретении ими индукционных свойств.

DISHEVELED И β -КАТЕНИН: СПЕЦИФИКАЦИЯ МИКРОМЕРОВ

Спецификация линии микромеров (и, следовательно, остальной части эмбриона) начинается внутри еще неподелившегося яйца. Два регулятора транскрипции Dishevelled и β -катенин, обнаруженные в цитоплазме яйца, наследуются микромерами, как только они образуются (т. е. при четвертом делении дробления). Dishevelled локализуется в вегетативном кортексе яйца (рис. 10.7А; Weitzel et al., 2004; Leonard and Ettensohn, 2007) и, оказываясь в микромерах и veg_2 -ярусе макромеров, предотвращает деградацию β -катенина. В результате β -катенин перемещается в ядра этих клеток, где соединяется с фактором

транскрипции TCF и активирует экспрессию генов со специфичных промоторов.

β -Катенин, по-видимому, является одним из самых ранних спецификаторов микромеров и эндомезодермы макромеров. Он накапливается в ядрах микромеров на 16-клеточной стадии, а затем в ядрах эндомезодермы на стадии 32 клеток (рис. 10.7Б). Накопление автономно и может происходить, даже если предшественники микромеров отделены от остальной части эмбриона, причем очень большое значение имеет хронология этого процесса. Ранняя активность β -катенина репрессирует в микромерах определенные гены-мишени, например *HesC* (см. ниже «Развиваем тему: *Pmar1* и *HesC*: путь двойного отрицания») и подавляет развитие эндомезодермы. Однако в эндомезодерме активность β -катенина начинается слишком поздно, чтобы репрессировать эти мишени, когда уже начали экспрессироваться гены, способствующие спецификации эндомезодермы.

Накопление β -катенина в ядрах способствует детерминации судеб и вегетативных клеток в мезодермальном и энтодермальном направлении (Kenney et al., 2003). Обработка эмбрионов морского ежа хлоридом лития приводит к накоплению β -катенина в ядрах всех клеток и превращает презумптивную эктодерму в энтодерму (рис. 10.7В). И наоборот, экспериментальные воздействия, ингибирующие накопление β -катенина в ядрах вегетативных клеток, предотвращают образование энтодермы и мезодермы (рис. 10.7Г; Logan et al., 1998; Wikramanayake et al., 1998).

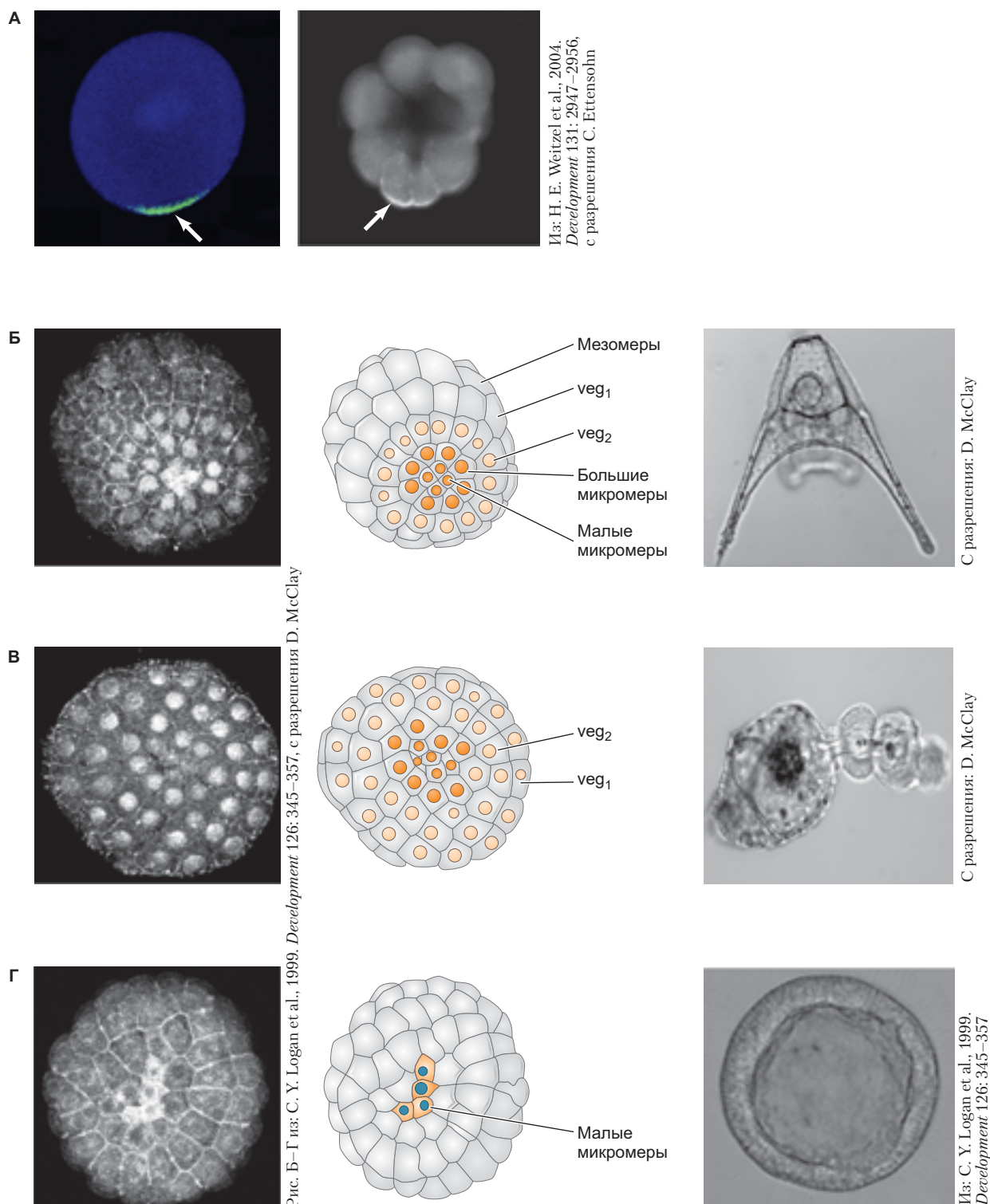


Рис. 10.7. Роль белков Dishevelled и β -катенина в спецификации вегетативных клеток эмбриона морского ежа. **А.** Локализация Dishevelled (*стрелки*) в вегетативном кортексе яйцеклетки морского ежа до оплодотворения (*слева*) и в формирующихся микромерах 16-клеточного эмбриона (*справа*). **Б.** Во время нормального развития β -катенин накапливается в ядрах микромеров и несколько меньше в клетках veg₂-яруса. **В.** В зародышах, обработанных хлоридом лития, β -катенин накапливается в ядрах всех клеток бластулы (вероятно, LiCl блокирует фермент GSK3 Wnt-пути), и клетки анимального полюса специфицируются как энтодерма и мезодерма. **Г.** При ингибировании транслокации β -катенина в ядро (он остается в цитоплазме) вегетативные клетки не специфицируются и весь эмбрион развивается в ресничный эктодермальный шар

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

PMAR1 И HESC: ПУТЬ ДВОЙНОГО ОТРИЦАНИЯ

Как именно синхронизация активности β -катенина приводит к развитию микромеров, а не макромеров? В этом процессе может участвовать фактор транскрипции Otx. Он тоже локализован в цитоплазме микромеров и, взаимодействуя с комплексом β -катенин/TCF, активирует транскрипцию Pmar1 в микромерах вскоре после их образования (16-клеточная стадия) (рис. 10.8А; Oliveri et al., 2008). А белок Pmar1, в свою очередь, репрессирует ингибитор микромерной спецификации HesC, экспрессирующийся во всех клетках эмбриона морского ежа, *кроме* микромеров. Напомним, что в микромерах β -катенин проявляет раннюю активность, следовательно, активирует Pmar1, что приводит к предотвращению экспрессии HesC и спецификации микромеров.

Механизм, посредством которого репрессор блокирует гены спецификации и эти гены могут быть разблокированы репрессором этого репрессора (другими словами, когда активация происходит путем репрессии репрессора), называют **двойной отрицательной связью** (10.8Б и 10.9А).

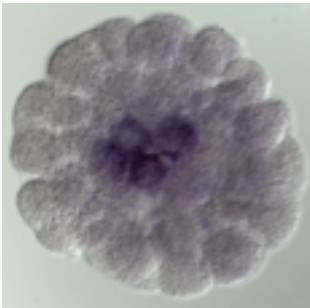
Такие связи позволяют жестко регулировать спецификацию развития: они способствуют экспрессии генов спецификации только там, где происходит необходимый сигнал (репрессия репрессора), и репрессируют те же гены в клетках любого другого типа (Oliveri et al., 2008).

HesC репрессирует ряд генов спецификации микромеров, связываясь с их энхансерами; к ним относятся *Alx1*, *Ets1*, *Tbr*, *Tel* и *SoxC*. Однако когда появляется белок Pmar1, он репрессирует HesC, и все эти гены становятся активными, «подталкивая» микромеры к их развитию в скелетогенные клетки (Revilla-i-Domingo et al., 2007; Peter and Davidson, 2016).

В отличие от регуляторного модуля с двойной отрицательной связью, определяющего судьбу микромеров, другая генная регуляторная сеть, специфицирующая скелетогенные клетки, включает механизм положительной обратной связи (рис. 10.9Б). Здесь ген А регулирует экспрессию гена В, а ген В регулирует экспрессию гена С. Ген С по положительной обратной связи регулирует экспрессию гена А, а это гарантирует, что сеть остается включенной, относительно стабильной и необратимой.

Из: P. Oliveri et al., 2008. *Proc Nat Acad Sci USA* 105: 5955–5962. Copyright (2008) National Academy of Sciences, U.S.A.; с разрешения P. Oliveri

А



Б

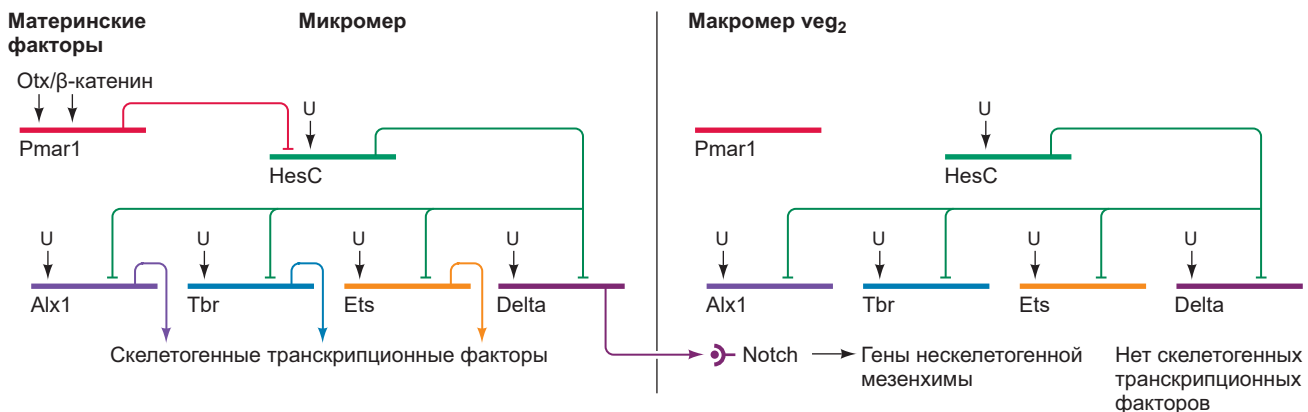


Рис. 10.8. Упрощенная иллюстрация двойной отрицательной связи в спецификации микромеров. **А.** Гибридизация *in situ* выявляет мРНК *Pmar1* (темно-фиолетовый) в микромерах. **Б.** Главный фактор транскрипции Otx и β -катенин из материнской цитоплазмы сосредоточены на вегетативном полюсе яйца. Эти регуляторы транскрипции попадают в микромеры и активируют ген *Pmar1*. *Pmar1* кодирует репрессор гена *HesC*, который, в свою очередь, кодирует репрессор (отсюда и берется «двойная отрицательная» связь) нескольких генов, участвующих в спецификации микромеров (например, *Alx1*, *Tbr* и *Ets*). Гены, кодирующие сигнальные белки (например, *Delta*), тоже находятся под контролем HesC. В микромерах, где активированный белок Pmar1 репрессирует репрессор HesC, микромерная спецификация и сигнальные гены активны. В клетках *veg₂* *Pmar1* не активируется и HesC выключает скелетогенные гены; однако клетки, содержащие Notch, могут реагировать на Delta-сигнал от скелетогенной мезенхимы. U обозначает повсеместно активные факторы транскрипции. (Рис. Б по данным: Oliveri et al., 2008. *Proc Nat Acad Sci USA* 105: 5955–5962. Copyright (2008) National Academy of Sciences, U. S. A.)

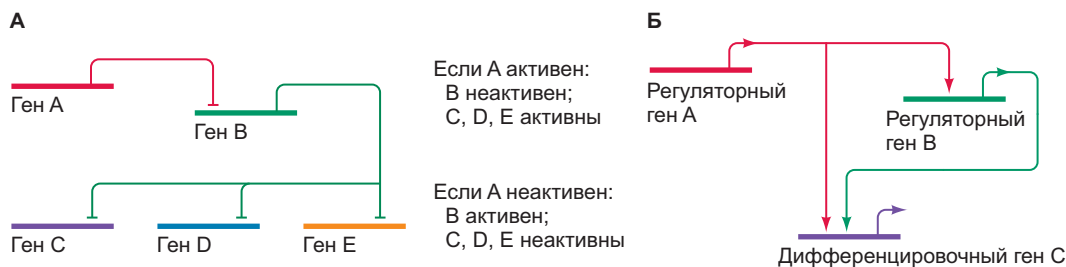


Рис. 10.9. «Логические схемы» для экспрессии генов. **А.** В схеме двойной отрицательной связи один ген кодирует репрессор целого ряда генов. Когда ген репрессора репрессирован, ряд генов экспрессируется. **Б.** В схеме прямой связи генный продукт А активирует как ген В, так и ген С, и ген В тоже активирует ген С. Схемы прямой связи обеспечивают эффективный способ усиления сигнала в одном направлении. (По данным: P. Oliveri et al., 2008. *Proc Nat Acad Sci USA* 105: 5955–5962. Copyright [2008] National Academy of Sciences, U. S. A.)



Загадки развития

Эволюция происходит через изменения в развитии. Такие изменения, в свою очередь, могут быть достигнуты путем изменений в генных регуляторных сетях. Как генные регуляторные сети клеток мезенхимы могут различаться у близкородственных видов, например морского ежа и морской звезды, личинка которой лишена скелетных элементов? (См. также гл. 25.)

что толкает их в направлении энтодермальной спецификации (Croce and McClay, 2010).

В итоге экспрессия генов в микромерах морского ежа автономно определяет их развитие, а также обусловлено определяет развитие их соседей. Входящие данные поступают из материнской цитоплазмы и активируют гены, снимающие репрессию определенных клеточных судеб. Как только материнские цитоплазматические факторы выполняют свои функции, в дело вступает эмбриональный геном.

Спецификация вегетативных клеток

Скелетогенные микромеры продуцируют также сигналы, которые могут вызывать изменения в соседних клетках. Одним из сигналов служит паракринный фактор суперсемейства TGF β активин. Экспрессия гена активина тоже находится под контролем двойной отрицательной связи *Pmar1-HesC*, и его секреция, по-видимому, является критической для образования энтодермы (Sethi et al., 2009). Действительно, если искусственно усилить экспрессию мРНК *Pmar1* в клетке анимального полушария с помощью микроинъекции, она станет клеткой скелетогенной мезенхимы, а ее соседи начнут развиваться как макромеры (Oliveri et al., 2002). Если при этом заблокировать сигнал активина, то соседние клетки энтодермой не станут (Ransick and Davidson, 1995; Sherwood and McClay, 1999; Sweet et al., 1999).

Другим специфицирующим клетки сигналом от микромеров служит юкстакринный белок Delta, который контролируется той же двойной отрицательной связью. Delta функционирует, активируя белки Notch на соседних клетках *veg₂* и позже на маленьких микромерах. Он заставляет клетки *veg₂* превращаться в клетки нескелетогенной мезенхимы, активируя фактор транскрипции Gsm и репрессируя фактор транскрипции Foxa (который активирует специфичные для энтодермы гены). Клетки *veg₁* не получают дельта-сигнал, поэтому сохраняют экспрессию Foxa,

Гастрюляция морского ежа

Архитектор Фрэнк Ллойд Райт в 1905 г. написал, что «форма и функция должны быть единым целым, соединенным духовным союзом». Несмотря на то что скелеты морских ежей никогда не были источником вдохновения для Райта, в отличие от других архитекторов (например, Антони Гауди); характерная личинка морских ежей **плутеус** — это полноценная структура, в которой форма и функции хорошо интегрированы.

Поздняя бластула морского ежа похожа на полный шарик, образованный примерно из 750 эпителиальных клеток. К этому времени клетки эктодермы, мезодермы и энтодермы уже частично специфицированы к приобретению своего окончательного пути развития. На следующей стадии развития в ходе морфогенетического процесса, известного как **гастрюляция**, происходит перемещение этих клеток в новые положения. В результате мезодермы клетки попадают под наружный эпителий и начинается инвагинация кишечной трубки. Как вы узнаете в следующих двух главах, во время гастрюляции эмбрионов большинства других животных эти два основных движения происходят одновременно. Однако у морского ежа они последовательны, так что сначала в бластоцель выселяются клетки мезодермы, а затем инвагинируют **архентерон** (первичная кишка).

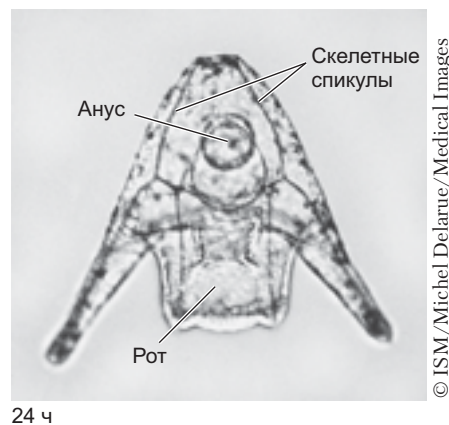
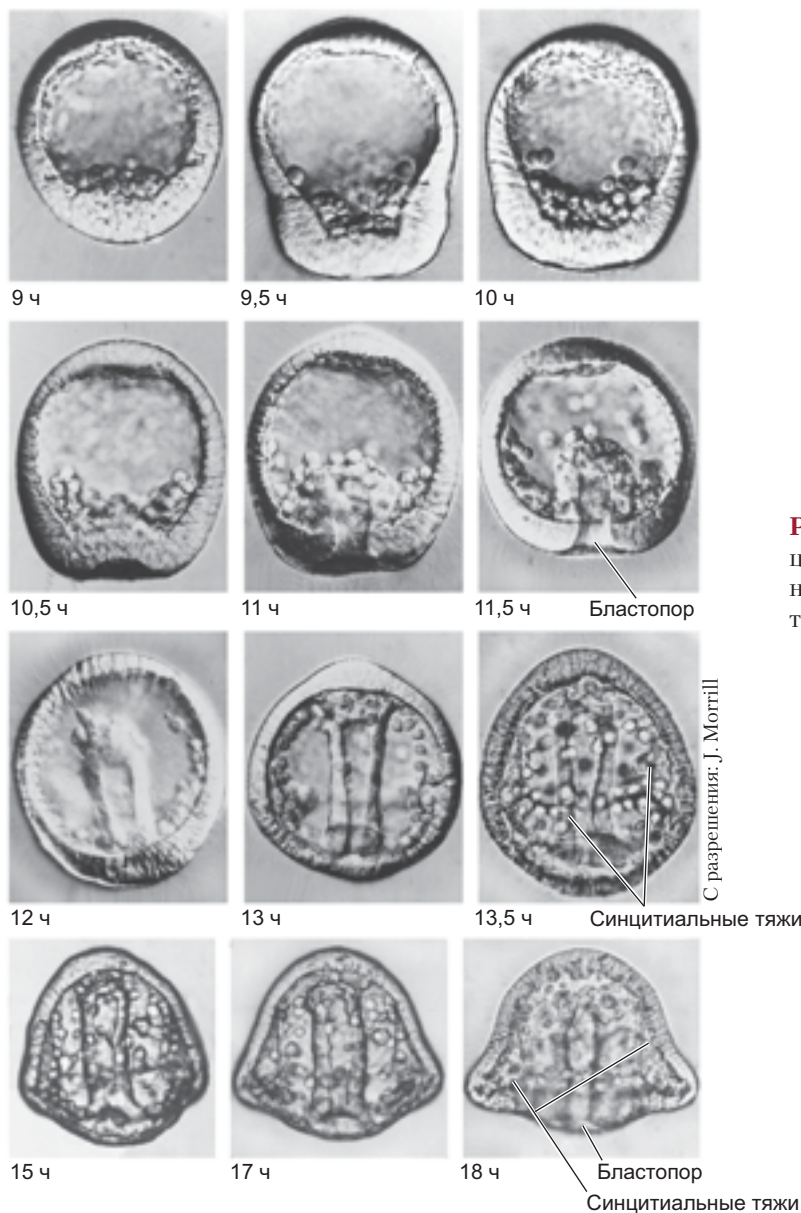


Рис. 10.10. Последовательные стадии гастрюляции морского ежа *Lytechinus variegatus*. Указанное время обозначает продолжительность развития при 25 °С

Ингрессия скелетогенной мезенхимы

На **рис. 10.10** представлено развитие морского ежа от стадии бластулы через гастрюляцию до стадии плутеуса (24 ч развития). Вскоре после того, как бластула вылупляется из оболочки оплодотворения, потомки больших микромеров претерпевают эпителиально-мезенхимальный переход. Эпителиальные клетки изменяют форму, теряют адгезию к соседним клеткам и, отделившись от эпителия, попадают в бластоцель в виде клеток скелетогенной мезенхимы (рис. 10.10, 9–10 ч). Затем клетки скелетогенной мезенхимы начинают вытягивать и сокращать длинные, тонкие (250 нм в диаметре и 25 мкм в длину) отростки, называемые **филоподиями**. Сначала клетки хаотично движутся по внутренней поверхности бластоцели, активно создавая и разрушая связи филоподий с компонентами его стенки. Однако

со временем они концентрируются в проспективной вентролатеральной области бластоцели. Здесь они сливаются в синцитиальные тяжи, которые формируют известковые оси спикул личиночного скелета. Этот процесс координирует та же генная регуляторная сеть, которая специфицировала клетки скелетогенной мезенхимы.

ЭПИТЕЛИО-МЕЗЕНХИМНЫЙ ПЕРЕХОД

Проникновение (ингрессия) потомков крупных микромеров в бластоцель происходит в результате того, что они теряют свое сродство к соседним клеткам и гиалиновой оболочке и приобретают сильное сродство к белкам, выстилающим бластоцель. Сначала все клетки бластулы связаны внешними поверхностями

с гиалиновым слоем, а внутренними — с базальной мембраной. Боковыми поверхностями каждая клетка контактирует с соседними. Финк и Макклей обнаружили, что проспективные клетки эктодермы и энтодермы (потомки мезомеров и макромеров соответственно) сильно связаны друг с другом и с гиалиновым слоем, но гораздо слабее — с базальной

мембраной. Микромеры сначала ведут себя так же, но меняют свойства при гастрюляции. В этот момент предшественники скелетогенной мезенхимы теряют сродство друг к другу и к гиалиновой оболочке (оно падает до 2% от их первоначального значения), в то время как их сродство к компонентам базальной пластинки и внеклеточного матрикса увеличивается

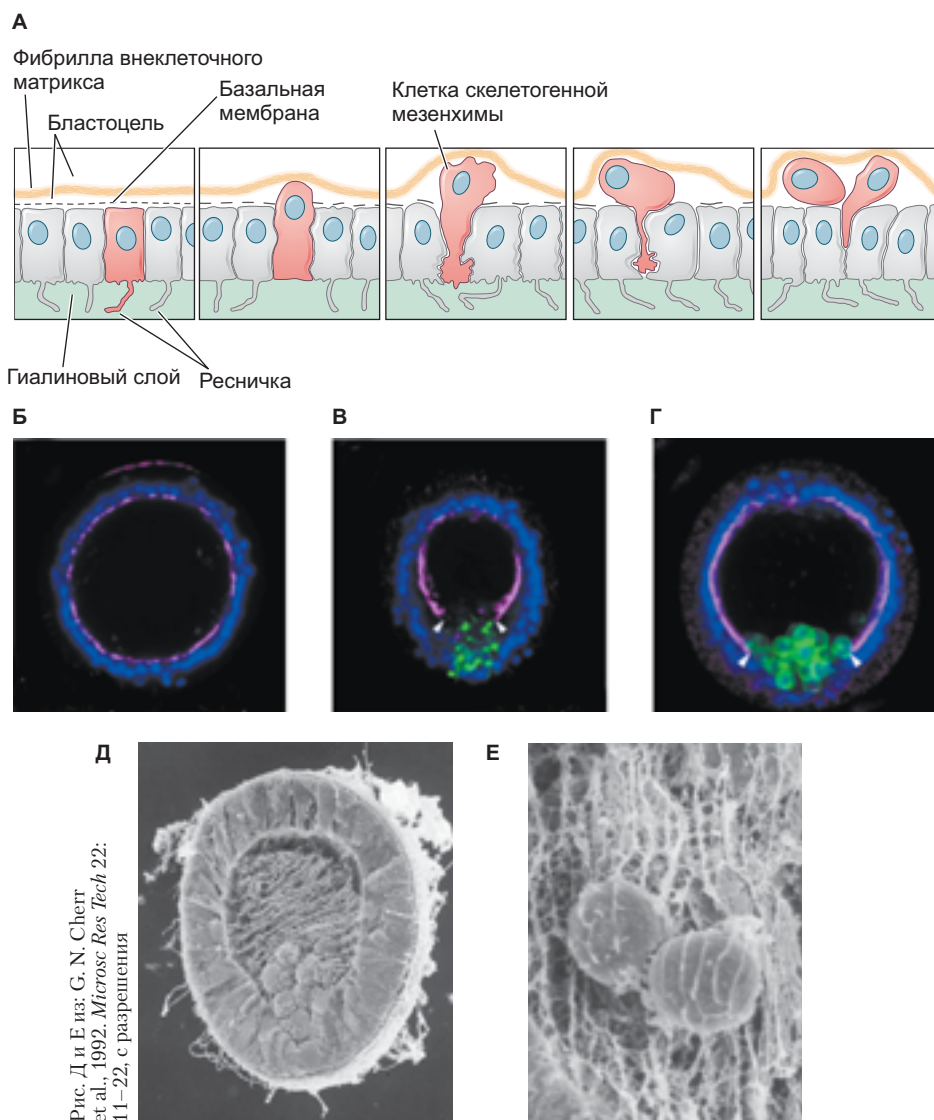


Рис. Б–Г: David McClay, с разрешения

Рис. Д и Е из: G. N. Cherr et al., 1992. *Microsc Res Tech* 22: 11–22, с разрешения

Рис. 10.11. Ингрессия клеток скелетогенной мезенхимы. **А.** Описание изменений адгезивного сродства клеток скелетогенной мезенхимы (розовый). Эти клетки теряют сродство к гиалину и к соседним blastomeres и в то же время приобретают сродство к белкам базальной мембраны. Немезенхимные blastomeres сохраняют свое первоначальное высокое сродство к гиалиновому слою и соседним клеткам. **Б–Г.** Клетки скелетогенной мезенхимы, прорывающиеся сквозь внеклеточный матрикс. Ламинин окрашен в розовый цвет, клетки мезенхимы зеленые, а ядра клеток синие. **Б.** Ламининовый матрикс равномерно распределен по краю blastocoela. **В.** В ламинине появляется брешь над вегетативными клетками, и мезенхима начинает проходить через нее в blastocoel. **Г.** В течение часа клетки оказываются в blastocoel. **Д.** Микрофотография, полученная на электронном микроскопе, клеток скелетогенной мезенхимы, заключенных во внеклеточный матрикс в ранней гастреле *Strongylocentrotus*. **Е.** Миграция мезенхимных клеток на стадии гастрюлы. Фибриллы внеклеточного матрикса blastocoela лежат параллельно анимально-вегетативной оси и тесно связаны с клетками скелетогенной мезенхимы. (Рис. А по данным: Н. Katow and М. Solursh, 1980. *J Exp Zool* 213: 231–246.)

в 100 раз. Так происходит **эпителио-мезенхимный переход** (ЭМП), в результате которого клетки, бывшие ранее частью эпителия, теряют свои контакты и становятся индивидуальными мигрирующими клетками (**рис. 10.11А**; см. также гл. 4).

Эпителиально-мезенхимальный переход — важное событие в течение всего развития животных, а также в раковых клетках, которые используют его для вторичных опухолевых образований. В ЭМП выделяют пять отдельных событий, находящихся под контролем одной и той же микромерной генной регуляторной сети, которая специфицирует и формирует скелетогенную мезенхиму. Однако каждый из этих процессов находится под контролем различных наборов факторов транскрипции. Еще более удивительно, что ни один из данных факторов транскрипции не является пионерным регулятором ЭМП (Saunders and McClay, 2014). Вот эти пять событий:

1. **Апикально-базальная полярность.** Вегетативные клетки бластулы удлинняются и образуют утолщенный эпителий вегетативной пластинки (**рис. 10.10**; 9 ч).
2. **Апикальное сужение микромеров.** Клетки изменяют форму и сжимают апикальный конец (дальше от бластоцеля). Апикальное сокращение можно наблюдать во время гастрულიции и нейруляции как у позвоночных, так и у беспозвоночных, это одно из наиболее важных изменений формы клеток, связанных с морфогенезом (Sawyer et al., 2010).
3. **Ремоделирование базальной пластинки.** Клетки должны проникнуть через базальную пластинку, содержащую ламинин. Исходно это однородная мембрана, однако микромеры секретируют протеазы (ферменты, расщепляющие белки), которые разрыхляют базальную пластинку незадолго до появления первых мезенхимных клеток (**рис. 10.11Б–Г**).
4. **Потеря адгезии.** Клетки теряют адгезию к своим соседям за счет разрушения кадгеринов, связывающих эпителиальные клетки. Подавление кадгеринов контролирует транскрипционный фактор Snail. Активация гена *snail* обусловлена транскрипционным фактором Alx1, который, в свою очередь, регулирует двойная отрицательная связь генной регуляторной сети (Wu et al., 2007). Транскрипционный фактор Snail участвует в процессе потери адгезии у всех животных (в том числе при раке).
5. **Клеточная подвижность.** Транскрипционные факторы генной регуляторной сети активируют те белки, которые вызывают активную миграцию клеток из эпителия в бластоцель. Наиболее важен из них Fохn2/3. Этот фактор транскрипции участвует также в регуляции движений клеток нервного гребня после их ЭМП, за счет которых происходит формирование лицевых структур у позвоночных. Клетки связываются с белками внеклеточного матрикса в бластоцеле и перемещаются по ним (**рис. 10.11Д–Е**).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

СКЕЛЕТОГЕНЕЗ ПОСЛЕ ЭМП

Оказавшись внутри бластоцеля, мезенхима продолжает находиться под контролем той же автономной генной регуляторной сети, которая ранее обеспечила эпителиально-мезенхимальный переход, а теперь контролирует скелетогенную дифференцировку. Кроме того, появляется новая неавтономная характеристика скелетогенеза: паракринные сигналы обеспечивают позиционирование и способствуют скелетогенной дифференцировке.

В двух местах рядом с будущей вентральной стороной личинки клетки скелетогенной мезенхимы собираются вместе, сливаются друг с другом и начинают формировать спикулы (Hodor and Etensohn, 1998; Lyons et al., 2014). Если меченый микромер вводить в бластоцель другого гастрულიрующего эмбриона морского ежа, он мигрирует в правильное место и участвует в формировании скелетных спикул (Etensohn, 1990; Peterson and McClay, 2003). Считается, что необходимую позиционную информацию предоставляют проспективные эктодермальные клетки и их базальные пластинки (**рис. 10.12А**; Harkey and Whiteley, 1980; Armstrong et al., 1993; Malinda and Etensohn, 1994). Только клетки скелетогенной мезенхимы (но не клетки других типов или латексные шарики) способны отвечать на эти сигналы (Etensohn and McClay, 1986). Чрезвычайно тонкие филоподии клеток скелетогенной мезенхимы ощущивают стенку бластоцеля и, по-видимому, чувствуют сигналы дорсально-вентральной и анимально-вегетативной разметки эктодермы (**рис. 10.12Б**; Malinda et al., 1995; Miller et al., 1995).

Формирование скелета запускается, когда скелетогенные клетки оказываются под двумя точками эктодермы, где получают одновременно паракринные факторы VEGF и FGF. VEGF выделяется из двух небольших областей эктодермы (Duloquin et al., 2007), а FGF образуется в экваториальном поясе между энтодермой и эктодермой (**рис. 10.12В**; Röttinger et al., 2008; McIntyre et al., 2014). Клетки скелетогенной мезенхимы мигрируют в точки синтеза VEGF и FGF и располагаются кольцом вдоль анимально-вегетативной оси (**рис. 10.13**). Экспрессию рецепторов этих паракринных факторов, по-видимому, контролирует двойная отрицательная связь (Peterson and McClay, 2003). Когда синцитиальные тяжи мезенхимных клеток начинают удлиняться, другие сигналы от эктодермы вносят дополнительную позиционную информацию, так что, в ответ на неклеточные автономные сигналы разметки, формируется скелет правильной формы.

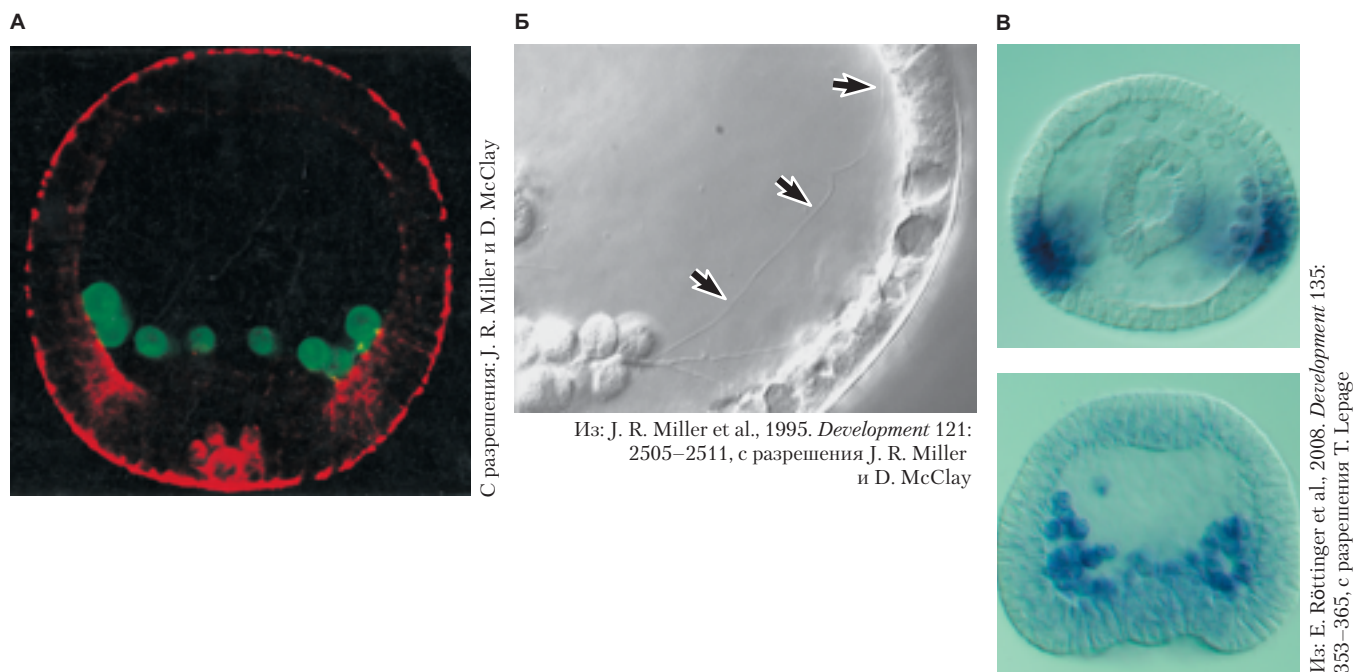


Рис. 10.12. Позиционирование скелетогенных мезенхимных клеток у морского ежа. **А.** Позиционирование микромеров для формирования известкового скелета определяют эктодермальные клетки. Скелетогенные мезенхимные клетки окрашены в *зеленый* цвет; β -катенин — в *красный*. По-видимому, скелетогенные мезенхимные клетки накапливаются в тех областях, для которых характерны высокие концентрации β -катенина. **Б.** На видеомикрофотографии, сделанной в технике Номарского, видны длинная тонкая филоподия, протягивающаяся от скелетогенной мезенхимной клетки к эктодермальной стенке гастролы (*стрелки*), а также более короткая филоподия, которая тянется внутрь от эктодермы. Мезенхимные филоподии протягиваются через внеклеточный матрикс и непосредственно контактируют с клеточной мембраной эктодермных клеток. **В.** На поперечном срезе гастролы (*вверху*) видно, что поверхностная эктодерма экспрессирует FGF в тех местах, где собираются скелетогенные микромеры. Кроме того, выселившиеся скелетные микромеры (*внизу*, продольный срез) экспрессируют рецептор FGF. Если подавить FGF-сигнализацию, скелет не сформируется должным образом

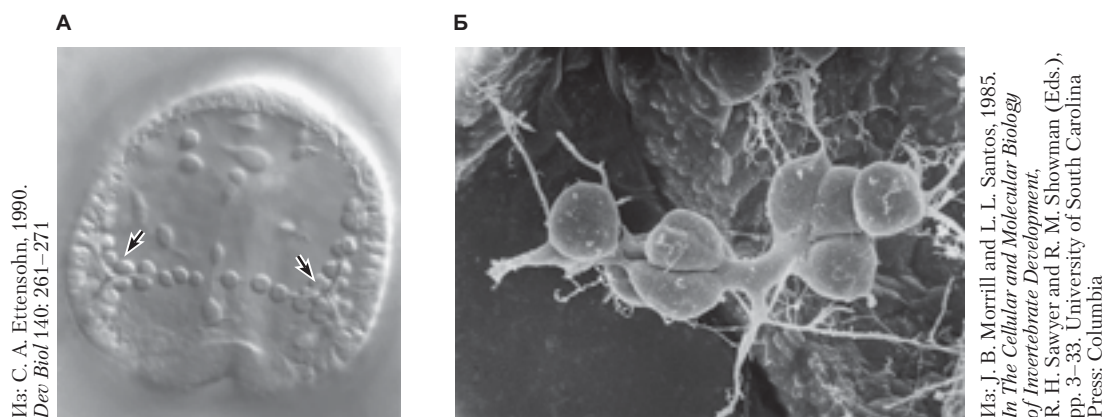


Рис. 10.13. Формирование синцитиальных тяжей клетками скелетогенной мезенхимы морского ежа. **А.** Клетки скелетогенной мезенхимы в ранней гастролы выстраиваются, сливаются и откладывают матрикс известковых скелетных спикул (*стрелки*). **Б.** Синцитиальные тяжи, образованные слиянием скелетогенных клеток мезенхимы (микрофотография получена на сканирующем электронном микроскопе)

Инвагинация архентерона

ПЕРВАЯ СТАДИЯ ИНВАГИНАЦИИ

По мере того как клетки скелетогенной мезенхимы покидают вегетативную область сферического зародыша, в остающихся там клетках происходят важные изменения: они утолщаются и сплющиваются, образуя вегетативную пластинку, изменяющую форму бластулы (см. рис. 10.10; 9 ч). Клетки вегетативной пластинки, все еще связанные друг с другом и с гиалиновой оболочкой, перемещаются и заполняют промежутки, оставшиеся после выселения скелетогенной мезенхимы. Вегетативная пластинка вворачивается внутрь за счет изменения формы клеток, после чего инвагинирует на глубину от четверти до половины бластоцеля и внезапно останавливается. Инвагинировавшую область называют первичной кишкой или архентероном, а его отверстие на вегетативном полюсе — **бластопором** (рис. 10.14А; см. также рис. 10.10; 10,5–11,5 ч).

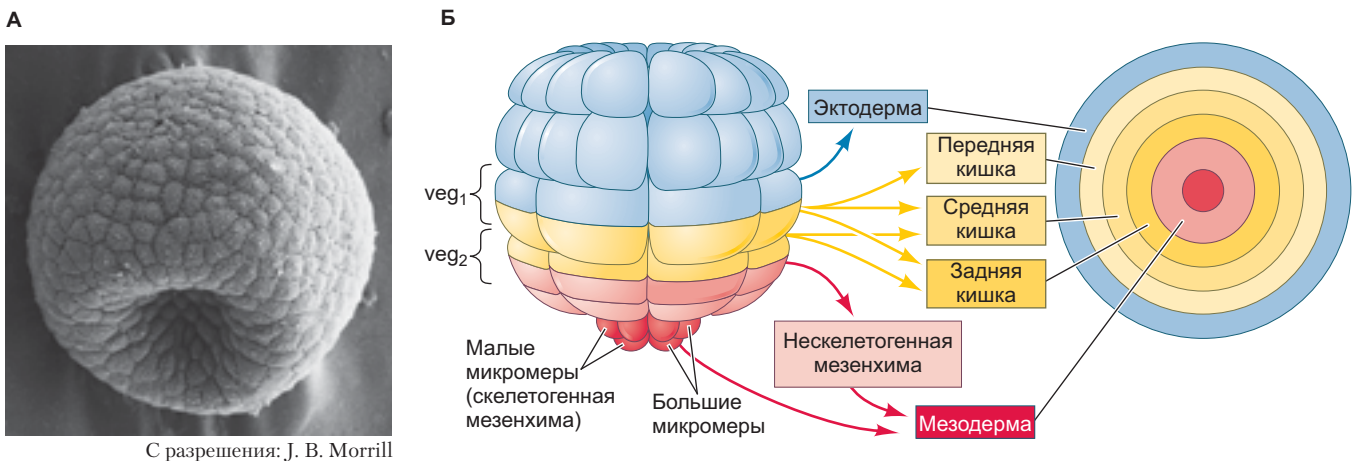
Вворачивание вегетативной пластинки, по-видимому, инициируют изменения формы ее клеток и находящегося под ними внеклеточного матрикса (Kominami and Takata, 2004). Актиновые микрофиламенты накапливаются в апикальных концах вегетативных клеток, заставляя концы сжиматься, в результате чего вегетативные клетки приобретают форму бутылки (колбовидную) и сгибаются внутрь (Kimberly and Hardin, 1998; Beane et al., 2006). Разрушение этих

клеток лазером замедляет гастрюляцию. Кроме того, гиалиновый слой на вегетативном полюсе прогибается внутрь из-за изменений его состава, вызванных клетками вегетативной пластинки (Lane et al., 1993).

На стадии, когда клетки скелетогенной мезенхимы начинают проникать в бластоцель, пути развития клеток вегетативной пластинки уже предопределены (Ruffins and Ettensohn, 1996). Нескелетогенная мезенхима включает в себя первые инвагинирующие клетки, которые образуют верхушку архентерона и прокладывают путь в бластоцель. Позже нескелетогенная мезенхима будет формировать пигментные клетки, мускулатуру вокруг кишечника и способствовать образованию целомических мешков. Энтодермальные клетки, происходящие из макромеров и прилегающие к нескелетогенной мезенхиме, становятся передней кишкой, мигрируя дальше всего в бластоцель. Слой энтодермальных клеток становится средней кишкой, а последний круговой ряд инвагинирующих клеток образует заднюю кишку и анус (рис. 10.14В).

ВТОРОЙ И ТРЕТИЙ ЭТАПЫ ИНВАГИНАЦИИ АРХЕНТЕРОНА

После первичной инвагинации и короткой паузы начинается вторая стадия формирования архентерона. Он резко удлиняется, иногда в три раза. В результате растягивания широкий короткий зачаток кишечника превращается в длинную тонкую трубку



С разрешения: J. B. Morrill

Рис. 10.14. Инвагинация вегетативной пластинки. **А.** Инвагинация вегетативной пластинки у *Lytechinus variegatus*, наблюдаемая на внешней поверхности ранней гастрюлы с помощью сканирующей электронной микроскопии. На фотографии хорошо виден бластопор. **Б.** Карта презумптивных зачатков вегетативной пластинки эмбриона морского ежа, вид с вегетативного полюса. Клетки центральной части становятся клетками нескелетогенной мезенхимы. Концентрические слои вокруг нее формируют переднюю, среднюю и заднюю кишки. Граница, где энтодерма встречается с эктодермой, соответствует анусу. Нескелетогенная мезенхима и кишка происходят из яруса *veg*₂; средняя кишка — из клеток *veg*₁ и *veg*₂; задняя кишка и эктодерма, окружающая ее, — из яруса *veg*₁. (Рис. Б по данным: C. Y. Logan and D. R. McClay, 1999. In *Cell Lineage and Determination*, S. A. Moody [Ed.], pp. 41–58. Academic Press: New York; S. W. Ruffins and C. A. Ettensohn, 1996. *Development* 122: 253–263.)

(рис. 10.15А; см. также рис. 10.10; 12 ч). В процессе происходит множество клеточных явлений. Во-первых, по мере того как клетки энтодермы попадают внутрь эмбриона, они пролиферируют. Во-вторых, дочерние клетки скользят относительно друг друга, как в телескопическом механизме. И наконец, клетки вклиниваются (интеркалируют) друг между другом, как при слиянии автомобильных потоков (Ettensohn, 1985; Hardin and Cheng, 1986; Martins et al., 1998; Martik and McClay, 2012). Явление, при котором за счет интеркаляции клеток происходит сужение и одновременно удлинение зачатка, называют **конвергентным растяжением**.

Третью и последнюю стадию удлинения архентерона инициирует напряжение, создаваемое клетками нескелетогенной мезенхимы на кончике архентерона. Эти клетки протягивают филоподии сквозь жидкость, заполняющую бластоцель, и контактируют с внутренней поверхностью стенки бластоцеля (Dan and Okazaki, 1956; Schroeder, 1981). Филоподии прикрепляются к стенке в местах межбластомерных контактов, а затем укорачиваются, подтягивая архентерон (рис. 10.15Б, В; см. также рис. 10.10; 12 и 13 ч). Хардин (1988) с помощью лазера удалял клетки нескелетогенной мезенхимы гаструл морского ежа *Lytechinus pictus*, в результате чего архентерон

мог удлиняться только до двух третей от нормальной длины. Если же оставалось несколько клеток нескелетогенной мезенхимы, удлинение продолжалось, хотя и медленнее. Таким образом, у этого вида клетки нескелетогенной мезенхимы играют важную роль в подтягивании архентерона к стенке бластоцеля в ходе последней стадии инвагинации.

В то время как верхняя часть архентерона встречается со стенкой бластоцеля в определенной целевой области, многие клетки нескелетогенной мезенхимы рассеиваются в бластоцеле, где они пролиферируют и образуют мезодермальные органы (см. рис. 10.10; 13,5 ч). Там, где архентерон соприкасается со стенкой, в итоге образуется ротовая ямка, которая сливается с архентероном и образует сквозную пищеварительную трубку личинки плутеуса.

Раннее развитие оболочников

Оболочники, среди которых наиболее известны и изучены асцидии, или морские спринцовки, удивительные животные по нескольким причинам, прежде всего потому что являются ближайшими эволюционными родственниками позвоночных. Как писал

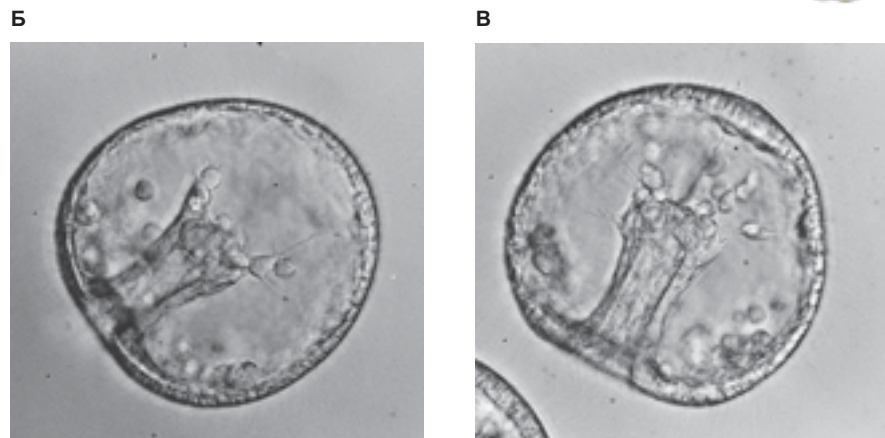
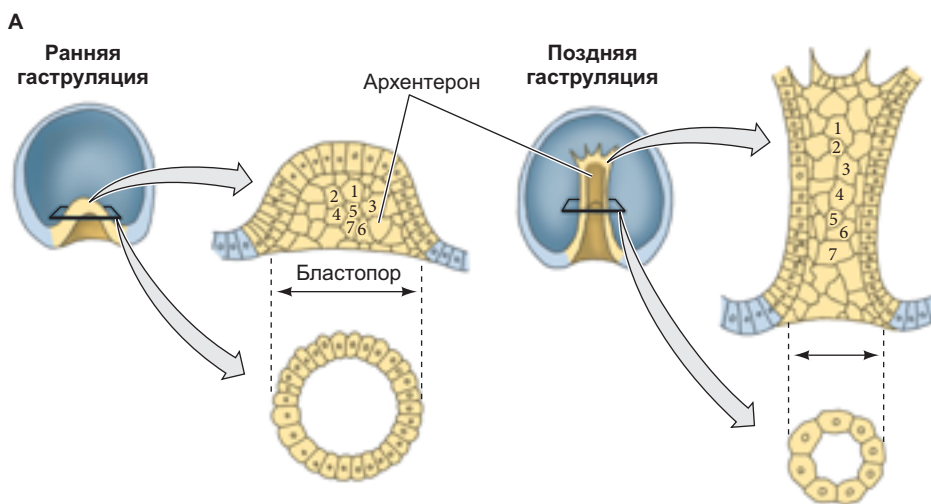


Рис. Б и В: С. Ettensohn, с разрешения

Рис. 10.15. Растяжение архентерона у эмбрионов морского ежа. **А.** Клеточные перестройки при растяжении архентерона. Ранний архентерон имеет 20–30 клеток в окружности. В ходе гастрюляции в результате конвергентных перемещений архентерон сужается до 6–8 клеток в окружности. **Б.** На стадии средней гастрюлы у *Lytechinus pictus* в бластоцель протягиваются филоподии от клеток нескелетогенной мезенхимы, расположенной на верхушке архентерона. **В.** Филоподии соединяют стенку бластоцеля с верхушкой архентерона. Натяжение филоподий можно оценить по тому, как они натягивают стенку бластоцеля в точках прикрепления. (Рис. А по данным: J. D. Hardin, 1990. *Semin Dev Biol* 1: 335–345.)

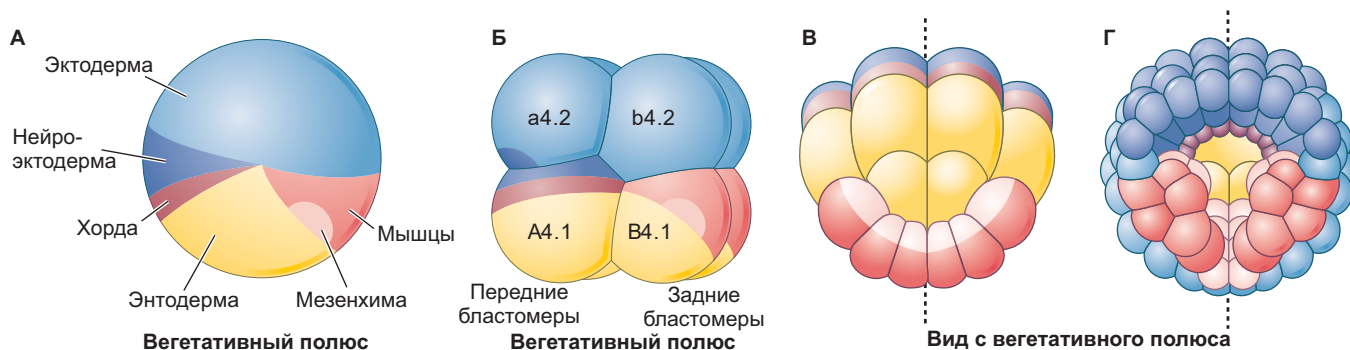


Рис. 10.16. Билатеральная симметрия в яйце асцидии *Styela partita* (генеалогия клеток *Styela* показана на рис. 1.13). **А.** Зигота до дробления. Области цитоплазмы, которым предстоит сформировать определенные органы, обозначены на рисунке одинаковым цветом. **Б.** Восьмиклеточный эмбрион с отмеченными бластомерами и их презумптивными зачатками. Эмбрион можно рассматривать как левую и правую четырехклеточные половины; с этого момента каждое деление на правой стороне эмбриона имеет зеркально-симметричное деление слева. **В, Г.** Более поздние эмбрионы, вид с вегетативного полюса. Пунктирная линия обозначает плоскость билатеральной симметрии. (По данным: В. I. Balinsky, 1981. *Introduction to Embryology*, 5th Ed. Saunders: Philadelphia.)

Лемэр (2009), глядя на взрослую асцидию, трудно и немного униительно представить, что мы близкие родственники этих существ. Хотя у оболочников на всех стадиях жизненного цикла отсутствуют позвонки, их свободноплавающая личинка, или головастик, имеет хорду и спинной нервный тяж, что позволяет отнести этих животных к беспозвоночным хордовым (см. рис. 10.1). Когда головастик асцидии подвергается метаморфозу, его нервный тяж и хорда дегенерируют и осевшая личинка выделяет целлюлозную оболочку, давшую название всей группе.

Дробление

У оболочников **билатеральное голобластическое дробление** (рис. 10.16). Наиболее поразительная особенность этого типа дробления в том, что первая плоскость дробления сразу устанавливает самую раннюю ось симметрии в зародыше, разделяя его на будущие правую и левую стороны. Каждое последующее деление ориентировано относительно этой плоскости симметрии, и полуэмбрион, сформированный на одной стороне первой плоскости дробления, является зеркальным отражением полуэмбриона на другой стороне. Второе деление дробления, как и первое, проходит меридионально, но не через центр яйца. Скорее, оно создает две большие передние клетки (бластомеры А и а) и две меньшие задние клетки (бластомеры В и в). На любой стороне зародыша теперь есть большой и маленький бластомеры.

В дальнейшем каждое клеточное деление 8–64-клеточного эмбриона асимметрично, и задние бластомеры всегда оказываются меньше передних (Nishida, 2005; Sardet et al., 2007). Перед каждым из неравномерных делений задняя центросома в бластомере

мигрирует к **притягивающему центросомы телу** (САВ) — макроскопической субклеточной структуре, состоящей из эндоплазматического ретикулума. САВ соединяется с клеточной мембраной через сеть белков PAR, которые располагают центросомы в клетке асимметрично (как у *C. elegans*; см. рис. 8.17), в результате чего в каждом из трех делений образуются одна большая и одна маленькая клетки. САВ притягивает также определенные мРНК таким образом, что при делениях они располагаются в самой задней (т. е. меньшей) клетке (Hibino et al., 1998; Nishikata et al., 1999; Patalano et al., 2006). Таким образом, САВ совмещают формирование паттерна клеток с их детерминацией¹. На 64-клеточной стадии образуется небольшой бластоцель, и с вегетативного полюса начинается гастрюляция.

Карта презумптивных зачатков асцидий

Большинство ранних бластомеров оболочников специфицируются автономно — каждая клетка приобретает определенный тип цитоплазмы, который будет определять ее развитие. У многих видов оболочников все области яйца имеют различную пигментацию; это позволяет легко увидеть, что идентичность клетки соответствует типу заполняющей ее цитоплазмы. Распределение цитоплазматических областей по яйцу происходит во время оплодотворения.

¹ Это описание должно напомнить вам разговор о задней цитоплазме яйца *Drosophila* в гл. 9. Действительно, мРНК сосредотачиваются в САВ за счет их 3'-UTR, САВ обогащены везикулами, и некоторые из мРНК САВ попадают в половые клетки, в то время как другие помогают разметить передне-заднюю ось (Makabe and Nishida, 2012).

На рис. 2.4 представлена карта презумптивных зачатков и генеалогия клеток асцидии *Styela partita*. В неоплодотворенной яйцеклетке серая цитоплазма в центре окружена кортикальным слоем, содержащим желтые липидные включения (рис. 10.17А). Во время мейоза растворение ядерной оболочки высвобождает прозрачное вещество, накапливающееся в анимальном полушарии яйца. В течение 5 мин после проникновения сперматозоида прозрачная внутренняя и желтая кортикальная цитоплазма стягиваются в вегетативное (нижнее) полушарие яйцеклетки (рис. 10.17Б; Prodon et al., 2005, 2008; Sardet et al., 2005). По мере того как мужской пронуклеус мигрирует от вегетативного полюса к экватору клетки вдоль будущей задней стороны эмбриона, желтые липидные включения перемещаются вместе с ним. Такое движение образует **желтый серп**, простирающийся от вегетативного полюса до экватора (рис. 10.17В, Г); эта область даст большую часть мышц хвоста личинки асцидии. Движение цитоплазматических областей зависит от микротрубочек, которые организует центриоль сперматозоида, и от волны ионов кальция (Sawada and Schatten, 1989; Speksnijder et al., 1990; Roegiers et al., 1995).

Как мы отмечали в гл. 2, Эдвин Конклин (1905) воспользовался разной окраской цитоплазматических областей, чтобы проследить за развитием каждой клетки зародыша асцидии (см. рис. 2.4А). Он обнаружил, что клетки, получающие прозрачную цитоплазму, становятся эктодермой, содержащие желтую цитоплазму, дают начало мезодермальным клеткам, получающие темно-серые включения, становятся энтодермой, и светло-серые клетки образуют нервную

трубку и хорду. Цитоплазматические области расположены билатерально-симметрично, поэтому делятся первой бороздой дробления на одинаковые правую и левую половины. Второе деление дробления приводит к тому, что презумптивная мезодерма лежит в двух задних клетках, тогда как презумптивная нейроектодерма и хордомезодерма (хорда) будут образованы из двух передних клеток (см. рис. 10.16). Третье деление разделяет цитоплазматические области так, что зачаток мезодермы начинают ограничивать два вегетативных задних бластомера, а презумптивную хордомезодерму — две передние вегетативные клетки.

Автономная и зависимая спецификация бластомеров оболочников

Автономная спецификация бластомеров оболочников стала одним из первых открытий в области экспериментальной эмбриологии (Chabry, 1888). Коэн и Беррилл (1936) показали, что личинки, полученные из изолированного правого или левого бластомера, имели ровно половину нормального числа клеток хорды и мышц, в результате чего подтвердили результаты Хабри и Конклина. Но если восьмиклеточный эмбрион разделить на четыре дуплета, содержащие эквивалентные правый и левый бластомеры, можно наблюдать как автономную, так и зависимую спецификацию (Reverberi and Minganti, 1946). Автономная спецификация происходит в энтодерме кишечника, мышечной мезодерме и покровной эктодерме (Lemaire, 2009). Зависимая спецификация (с помощью индукции) проявляется в образовании

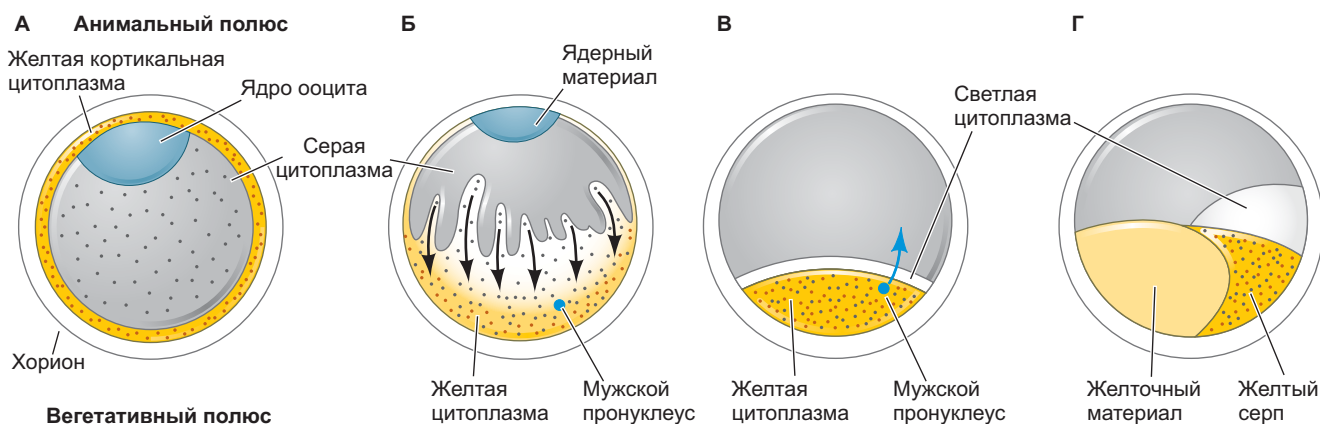


Рис. 10.17. Цитоплазматические перестройки в оплодотворенной яйцеклетке *Styela partita*. **А.** Перед оплодотворением желтая кортикальная цитоплазма окружает серую (желточную) внутреннюю цитоплазму. **Б.** После вхождения сперматозоида в вегетативное полушарие ооцита желтая кортикальная цитоплазма и прозрачная цитоплазма, возникшая в результате разрушения ядра ооцита, стягиваются вегетативно по направлению к сперматозоиду. **В.** По мере того как мужской пронуклеус мигрирует анимально к вновь сформировавшемуся женскому пронуклеусу, желтая цитоплазма и прозрачная цитоплазма движутся вместе с ним. **Г.** Окончательное положение желтой цитоплазмы отмечает место, где клетки будут давать начало мышцам хвоста. (По данным: E. G. Conklin, 1905, *J Acad Nat Sci Phila* 13: 5–119.)

клеток головного мозга, хорды, сердца и мезенхимы. Оказывается, что большинство клеточных линий оболочников возникает с помощью определенных индукционных процессов.

АВТОНОМНАЯ СПЕЦИФИКАЦИЯ МИОПЛАЗМЫ: ЖЕЛТЫЙ СЕРП И МАСНО-1

Как упоминалось в гл. 2, если на восьмиклеточной стадии экспериментально перенести цитоплазму желтого серпа из бластомера В4.1 (промышечный) в бластомер b4.2 или a4.2 (проэктодермальные), то бластомеры, в норме дающие только эктодерму, формируют наряду с ней мышечные клетки. Нишида и Савада (2001) выяснили, что образующей мышцы детерминантой является мРНК, кодирующая транскрипционный фактор, который они назвали *Macho-1*. Исследователи показали, что мРНК *macho-1* присутствует в нужном месте и в нужное время и является необходимым и достаточным условием для того, чтобы клетки формировали мышцы (см. рис. 2.6).

Белок *Macho-1* служит транскрипционным фактором, необходимым для активации нескольких мезодермальных генов, в том числе *tbx6*, *snail*, и гены мышечного актина и миозина (Yagi et al., 2004; Sawada et al., 2005). Среди продуктов этих генов только белок *Tbx6* фенотипирует (имитирует) функцию *Macho-1* и вызывает эктопическую дифференцировку мышц. По-видимому, *Macho-1* непосредственно активирует набор генов *tbx6*, а белок *Tbx6* — дальнейшее развитие мышц (Yagi et al., 2005; Kugler et al., 2010). Предполагается, что *Macho-1* и *Tbx6* активируют (возможно, по механизму прямой связи) и специфичный для мышц ген *snail*. Белок *Snail* играет важную роль в предотвращении экспрессии

Brachyury в презумптивных мышечных клетках и, таким образом, предотвращает превращение предшественников мышечных клеток в клетки хорды. Похоже, что *Macho-1* является критическим фактором транскрипции желтого серпа, формирующей мышцы цитоплазмы. *Macho-1* активирует каскад транскрипционных факторов, который способствует дифференцировке мышц и в то же время ингибирует спецификацию хорды.

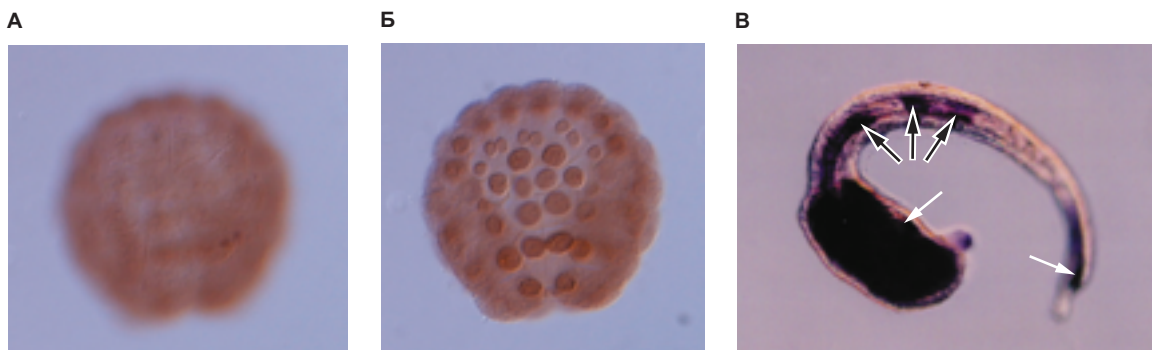


Загадки развития

Нервная система есть у оболочников на личиночной стадии, но дегенерирует во время метаморфоза. Рассмотрите нервную трубку позвоночного, например рыбы, и то, как она разделяется на передний, средний, задний и спинной мозг (см. гл. 13). Как определить, похожи ли нервные трубки оболочников и позвоночных? Гомологичны они или аналогичны (см. гл. 24)?

АВТОНОМНАЯ СПЕЦИФИКАЦИЯ ЭНТОДЕРМЫ: β -КАТЕНИН

Презумптивная энтодерма возникает из вегетативных бластомеров А4.1 и В4.1. Спецификация этих клеток согласована с локализацией β -катенина (напомним, что β -катенин участвует в спецификации энтодермы и у эмбрионов морского ежа). Ингибирование β -катенина в зародыше асидии приводит к потере энтодермы и ее замещению эктодермой (рис. 10.18; Imai et al., 2000). И наоборот, увеличение синтеза β -катенина вызывает приращение энтодермы за счет эктодермы (как и у морских ежей). Фактор транскрипции β -катенин, по-видимому, функциони-



Из: K. S. Imai et al., 2000. *Development* 127: 3009–3020, с разрешения H. Nishida и N. Satoh

Рис. 10.18. Окрашивание антителами против белка β -катенина позволяет определить его участие в формировании энтодермы. **А.** β -Катенин не обнаруживается в ядрах анимального полюса 110-клеточного эмбриона *Ciona*. **Б.** Напротив, β -катенин легко обнаружить в ядрах клеток-предшественников вегетативной энтодермы на стадии 110 клеток. **В.** Если β -катенин экспрессируется в клетках-предшественниках хорды, эти клетки становятся энтодермой и экспрессируют энтодермальные маркеры, такие как щелочная фосфатаза. Белыми стрелками показана нормальная энтодерма; черными стрелками — клетки хорды, которые экспрессируют энтодермальные ферменты

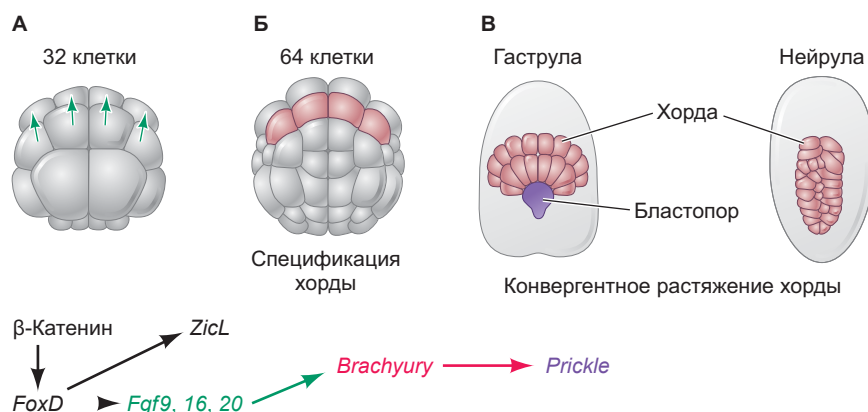


Рис. 10.19. Упрощенная версия генной сети, приводящей к развитию хорды у ранних зародышей оболочников. **А, Б.** 32- и 64-клеточные эмбрионы *Ciona*, вид с вегетативного полюса. **А.** Накопление β -катенина приводит к экспрессии гена *foxd*. Белок *Foxd* специфицирует клетки стать энтодермальными и секретировать FGF. **Б.** FGF индуцируют экспрессию *Brachyury* в соседних клетках, которые в результате станут хордой. **В.** Вид с дорсальной стороны. *Brachyury* активирует регуляторы клеточной активности, такие как *Prickle*, которые влияют на клеточную полярность и приводят к конвергентному растяжению хорды на стадиях гастрюлы и нейрулы. (По данным: B. Davidson and L. Christiaen, 2006. *Cell* 124: 247–250.)

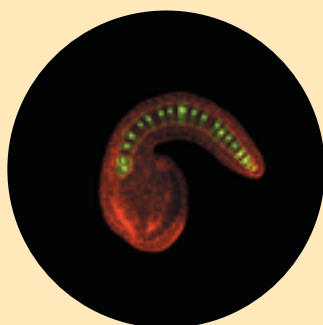
рует через активацию синтеза гомеобоксного транскрипционного фактора *Lhx3*. Ингибирование *lhx3* препятствует дифференцировке энтодермы (Satou et al., 2001).

ЗАВИСИМАЯ ОТ ЭНТОДЕРМЫ СПЕЦИФИКАЦИЯ МЕЗЕНХИМЫ И ХОРДЫ

Хотя большинство мышц оболочников специфицируется автономно из цитоплазмы желтого серпа, большинство задних мышечных клеток формируется путем обусловленной спецификации при взаимодействии с потомками бластомеров A4.1 и B4.2 (Nishida, 1987, 1992a, b). Кроме того, хорда, мозг, сердце и мезенхима также формируются посредством индукционных взаимодействий. Хорду и мезенхиму, по-видимому, индуцируют FGF, секретируемые клет-

ки энтодермы (Nakatani et al., 1996; Kim et al., 2000; Imai et al., 2002). Эти белки индуцируют экспрессию *Brachyury*, который связывается с *cis*-регуляторными элементами, специфицирующими развитие хорды (рис. 10.19; Davidson and Christiaen, 2006).

Интересно, что гены, которые транскрипционный фактор *Brachyury* включает рано, имеют несколько сайтов связывания с ним и для максимального эффекта необходимо, чтобы все эти сайты были заняты. Гены, которые *Brachyury* включает чуть позже, имеют только один сайт, и этот сайт может связывать *Brachyury* не так сильно. Активация генов хорды происходит еще позже и косвенно. В последнем случае *Brachyury* активирует второй транскрипционный фактор, который затем активирует эти более поздние гены (Katikala et al., 2013; José-Edwards et al., 2015). Так происходит точная регуляция времени включения генов в хорде.



С разрешения: Anna Di Gregorio

О фотографии в начале главы

Клетки личинки асцидии флуоресцируют, потому что экспрессируют меченый ген-мишень для белка *Brachyury*, что идентифицирует их как клетки, которые будут формировать хорду. И у оболочников, и у позвоночных хорда не только выполняет опорную функцию, но и заставляет эктодермальные клетки над ней становиться нервной трубкой. Таким образом, оболочники — беспозвоночные хордовые (не имеют позвоночника, но имеют хорду). Когда Александр Ковалевский открыл это в 1866 г., Чарльз Дарвин был взбудоражен осознанием того, что оболочники являются эволюционной связью между беспозвоночными и позвоночными. Сегодня известно, что транскрипционный фактор *Brachyury* важен для формирования хорды как у оболочников, так и у позвоночных, что доказывает открытие Ковалевского с молекулярной точки зрения.



Коротко

Морские ежи и асцидии

1. Как у морских ежей, так и у оболочников blastopore становится анусом, а рот образуется в другом месте; вторичноротый режим гастрюляции характерен и для хордовых (включая позвоночных).
2. Дробление клеток у морского ежа радиальное и голобластическое. Однако при четвертом делении вегетативный ярус бластомеров делится на крупные макромеры и маленькие микромеры. Анимальное полушарие образует мезомеры.
3. Развитие клеток морского ежа определяет как автономный, так и обусловленный режим спецификации. Микромеры специфицируются автономно и становятся основным сигнальным центром для обусловленной спецификации других линий клеток. Материнский β -катенин играет важную роль в автономной спецификации микромеров.
4. Среди механизмов гастрюляции у морских ежей большое значение имеет неодинаковая клеточная адгезия. Сначала микромеры отделяются от вегетативной пластинки и выходят в бластоцель. Затем они образуют скелетогенную мезенхиму, которая формирует скелетные спикулы личинки плутеуса. Вегетативная пластинка инвагинирует и образует энтодермальный архентерон с клетками нескелетогенной мезенхимы на верхушке. Архентерон удлиняется за счет конвергентного растяжения и направляется в область будущего рта с помощью нескелетогенной мезенхимы.
5. Большие микромеры образуют скелет личинки; маленькие микромеры принимают участие в формировании целомических мешков и половых клеток.
6. Микромеры регулируют статус соседних клеток юкстакринно и паракринно. Они способны превращать клетки анимального полушария в энтодерму.
7. Генные регуляторные сети координируют дифференцировку. В микромерах собраны материнские компоненты таким образом, что локализация Dishevelled на вегетативном полюсе позволяет формировать β -катенин, активирующий ген *Pmar1*, продукты которого ингибируют ген *HesC*. *HesC*, в свою очередь, ингибирует скелетогенные гены. Таким образом, путем локального подавления ингибитора большинство вегетативных клеток коммитируются к формированию скелета. Это называют двойной отрицательной связью.
8. Выселение скелетогенной мезенхимы осуществляется через эпителиально-мезенхимальный переход, при котором ее клетки теряют кадгерины и приобретают адгезию к матриксу внутри бластоцеля.
9. Инвагинацию и рост архентерона координируют изменения формы клеток, пролиферация и конвергентное растяжение. На последнем этапе инвагинации верхушку архентерона активно притягивают к крыше бластоцеля филоподии клеток нескелетогенной мезенхимы.
10. Дробление оболочников голобластическое и билатеральное.
11. Желтая цитоплазма содержит формирующие мышцы детерминанты, которые действуют автономно. Сердце и нервная система формируются обусловленно путем сигнальных взаимодействий бластомеров.
12. Мышечная детерминанта оболочников *Macho-1* — фактор транскрипции, достаточный для активации мышечно-специфичных генов. Хорда и мезенхима образуются обусловленно с помощью паракринных факторов, в частности FGF.
13. FGF индуцируют экспрессию *Brachyury* в соседних клетках и вызывают образование хорды из этих клеток.

Амфибии и рыбы

11

Две противоположности, созданные
двумя противоположностями



С разрешения: Christine Thisse

Несмотря на огромные различия в морфологии взрослых организмов, раннее развитие в каждой из групп позвоночных очень схоже. Рыбы и амфибии являются одними из наиболее легко изучаемых позвоночных. И те и другие откладывают сотни яиц, а оплодотворение и развитие происходят полностью вне организма. Рыбы и амфибии — это ананеотические позвоночные животные (**рис. 11.1**), т. е. у них не образуется амнион, позволяющий зародышам развиваться на суше. Несмотря на такую особенность развития, амфибии и рыбы используют многие из тех же генов и процессов, которые участвуют в развитии других позвоночных (в том числе и человека) при образовании осей и органов тела.

Раннее развитие амфибий

Когда-то зародыши амфибии доминировали как модели в области экспериментальной эмбриологии. Эмбрионы саламандры и лягушки превосходно подходили для исследований по трансплантации благодаря своим крупным клеткам и быстрому развитию. Однако при возникновении генетики развития они утратили популярность, отчасти потому, что эти животные проходят длительный период роста, до того как становятся фертильными, а также потому, что их хромосомы часто присутствуют в виде дуплицированных копий, что усложняет создание мутаций. Но с появлением молекулярных методов, таких как гибридизация *in situ*, иммунопреципитация хроматина, использование антисмысловых олигонуклеотидов и доминантно-негативных белков, исследователи вернулись к изучению эмбрионов амфибий и смогли объединить итоги своих молекулярных исследований с более ранними экспериментальными данными. Результаты были впечатляющими, ведь

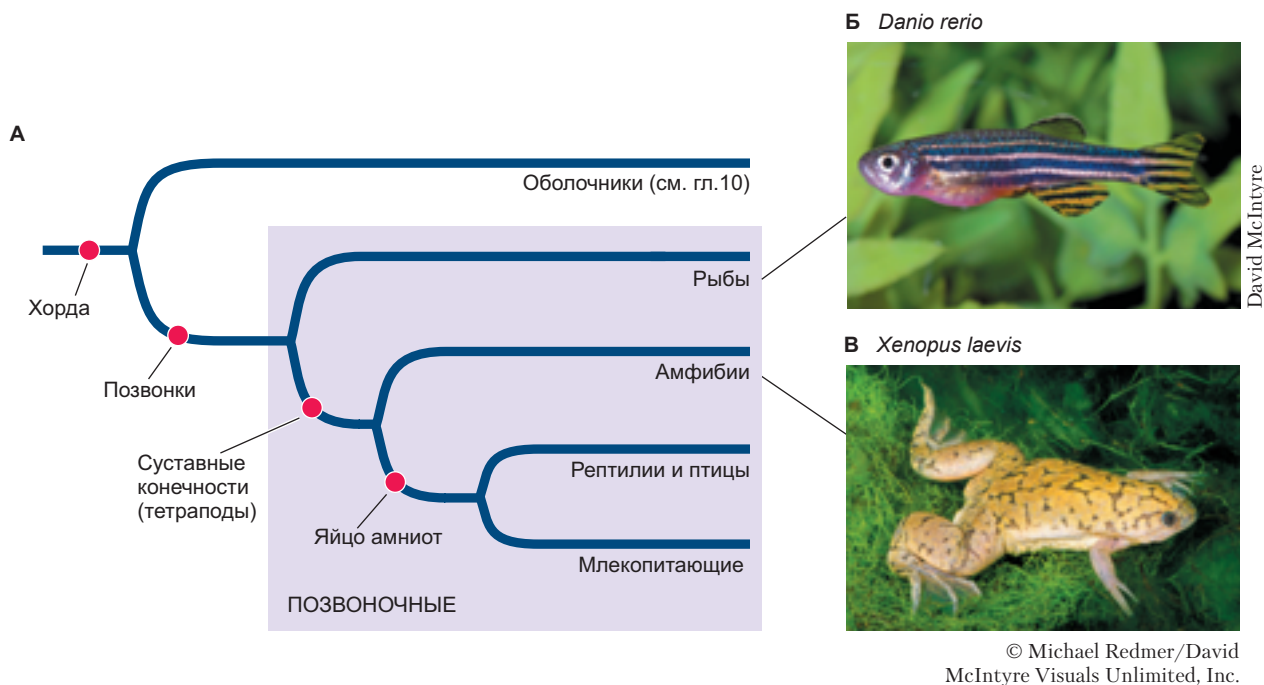


Рис. 11.1. А. Филогенетическое древо хордовых, показывающее взаимоотношения групп позвоночных. Эмбриональное развитие рыб и амфибий должно осуществляться во влажной среде. Возникновение в эволюции скорлупы у яиц амниот позволило рептилиям и их потомкам развиваться на суше (см. гл. 12). **Б.** *Danio rerio* стала популярным модельным организмом для изучения процессов развития. Это первый вид позвоночных, на котором провели исследования мутагенеза, аналогичные экспериментам на *Drosophila*. **В.** *Xenopus laevis*, африканская шпорцевая лягушка, является одной из наиболее изученных амфибий, так как обладает редким свойством: у нее отсутствует сезонность размножения и, следовательно, она может производить зародыши круглый год

они открывали новые перспективы для понимания того, как происходит разметка тела позвоночных животных и как они организованы. Как писал Жан Ростан в 1960 г., «теории приходят и уходят. Лягушка остается».

Оплодотворение, кортикальная ротация и дробление

Большинству лягушек свойственно наружное оплодотворение, когда самец оплодотворяет яйца по мере того, как самка откладывает их. Еще до оплодотворения яйцо лягушки поляризовано таким образом, что плотный желток находится на вегетативном (нижнем) полюсе, а в анимальной части яйца (верхняя половина) желтка меньше. Как мы увидим далее, некоторые белки и мРНК на этом этапе уже локализованы в определенных областях неоплодотворенного яйца.

Оплодотворение чаще всего происходит в случайном месте анимального полушария яйцеклетки амфибии. Тенденция к связыванию сперматозоида с яйцеклеткой в анимальном полушарии может

быть обусловлена пространственно-ограниченным взаимодействием поверхностных гликопротеинов сперматозоида с вителлиновой оболочкой и клеточной мембраной на анимальном полюсе яйца (Nagai et al., 2009; Kubo et al., 2010). Расположение точки проникновения сперматозоида имеет значение, так как оно влияет на дорсально-вентральную полярность. Точка проникновения сперматозоида становится вентральной (брюшной) стороной эмбриона, а точка, расположенная на 180° напротив нее, будет дорсальной (спинной) стороной. Центриоль сперматозоида, которая входит в яйцеклетку с ядром, организует микротрубочки яйца в параллельные ряды в вегетативной цитоплазме, отделяя внешнюю кортикальную от внутренней желтковой цитоплазмы (рис. 11.2А, Б). Микротубулярные ряды позволяют кортикальной цитоплазме вращаться относительно внутренней цитоплазмы. Действительно, эти структуры видны непосредственно перед началом вращения, затем, когда вращение прекращается, постепенно выравниваются и исчезают (Elinson and Rowning, 1988; Houliston and Elinson, 1991). Кортикальная цитоплазма зиготы смещается примерно на 30° относительно внутренней цитоплазмы (рис. 11.2В). В некоторых случаях при этом обнажается область

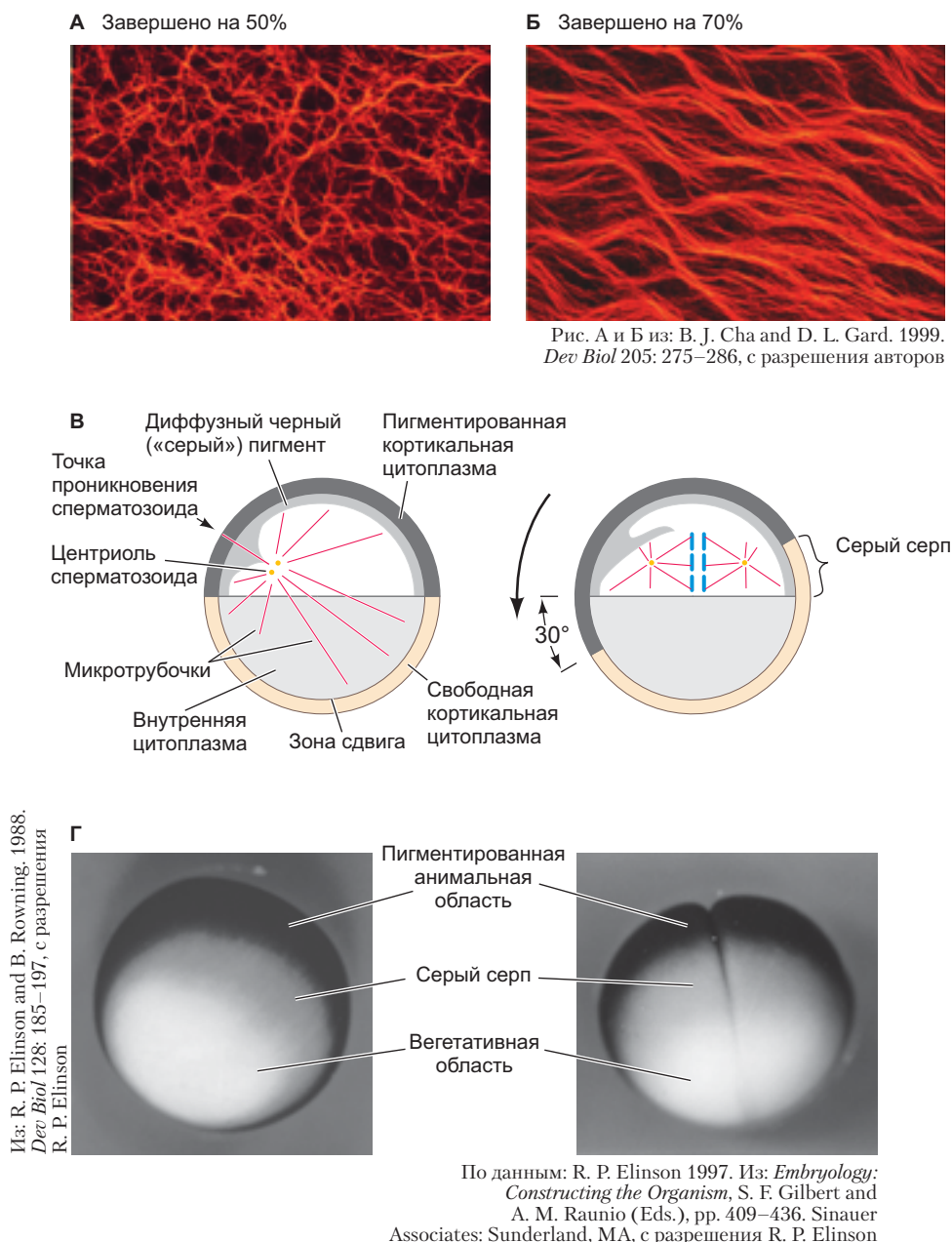


Рис. 11.2. Реорганизация цитоплазмы и кортикальная ротация создают серый серп в яйцеклетках лягушек. **А, Б.** Параллельные ряды микротрубочек (визуализированные здесь с использованием флуоресцентных антител к тубулину) образуются в вегетативном полушарии яйцеклетки вдоль будущей дорсально-вентральной оси. **А.** Когда первый клеточный цикл завершен на 50%, в клетке присутствуют микротрубочки, но им не хватает полярности. **Б.** По завершении 70% цикла вегетативная зона сдвига характеризуется параллельными рядами микротрубочек; в это время начинается кортикальная ротация. После окончания вращения микротрубочки деполимеризуются. **В.** Схема кортикальной ротации в поперечном сечении. Слева показана яйцеклетка в середине первого клеточного цикла. Она имеет радиальную симметрию по анимально-вегетативной оси. Ядро сперматозоида вошло с одной стороны и мигрирует внутрь. На рисунке справа кортикальная цитоплазма поворачивается на 30° относительно внутренней цитоплазмы при завершении 80% первого деления дробления. Гастрюляция начнется в сером серпе — области, противоположной точке проникновения сперматозоида, где происходит наибольшее смещение цитоплазмы. **Г.** Серый серп лягушки *Rana pipiens*. Сразу после окончания кортикальной ротации (слева) под сильно пигментированной кортикальной цитоплазмой обнажается светло-серая пигментация. Первая борозда дробления (справа) делит этот серый серп пополам. (Рис. В из: J. C. Gerhart et al., 1989. *Development Suppl* 107: 37–51.)

серой внутренней цитоплазмы, расположенной прямо напротив точки проникновения сперматозоида (рис. 11.2Г; Roux, 1887; Ancel and Vintenberger, 1948). В этой области под названием **серый серп**, впоследствии начнется гастрюляция (Manes and Elinson, 1980; Vincent et al., 1986).

Гастрюляционные движения начинаются на стороне яйца, противоположной точке проникновения сперматозоида, в области, которая станет дорсальной частью зародыша. Ряды микротрубочек, организованные центриолью сперматозоида при оплодотворении, поддерживают дорсально-вентральную спецификацию клеток и тем самым влияют на эти движения. Следовательно, образование дорсально-вентральной оси личинки можно проследить от точки проникновения сперматозоида! Иными словами, зигота лягушки уже «узнала» о своей голове от хвоста.

Неравномерное радиальное голобластическое дробление

У большинства зародышей лягушки и саламандры радиально-симметричное голобластическое дробление, схожее с иглокожими. Несмотря на сходство, яйцеклетки земноводных намного крупнее яиц иглокожих и содержат гораздо больше желтка. По мере дробления желток неравномерно распределяется между клетками вегетативного полушария. В гл. 1 уже упоминалось, что высокие концентрации желтка являются препятствием для деления клеток; в связи с этим желток замедляет продвижение борозды дробления на вегетативном полюсе. Таким образом, первое деление берет начало на анимальном полюсе и медленно распространяется вниз в вегетативную область (рис. 11.3А, Г). Кроме того, когда первая борозда дробления все еще делит богатую желтком цитоплазму вегетативного полушария, в области анимального полюса уже начинается второе деление дробления. Для тех видов, у которых образуется серый серп (особенно саламандры и лягушки рода *Rana*), первое деление дробления обычно делит серый серп пополам (см. рис. 11.2Г). Второе деление проходит под прямым углом к первому и тоже является меридианальным. Третье деление экваториальное, однако оно асимметрично смещено к анимальному полюсу, вновь под влиянием вегетативно расположенного желтка (Valles et al., 2002). Оно делит эмбрион амфибии на четыре малых бластомера (микромера) и четыре крупных бластомера (макромера) в вегетативной области. Несмотря на неравные размеры, деление бластомеров продолжается с одинаковой скоростью до наступления 12-го клеточного цикла. При последующем дроблении анимальную область заполняют многочисленные небольшие клетки, в то время как вегетативная область содержит меньшее число крупных макромеров, наполненных желтком. Эмбрион земноводных, содержащий от 16 до 64

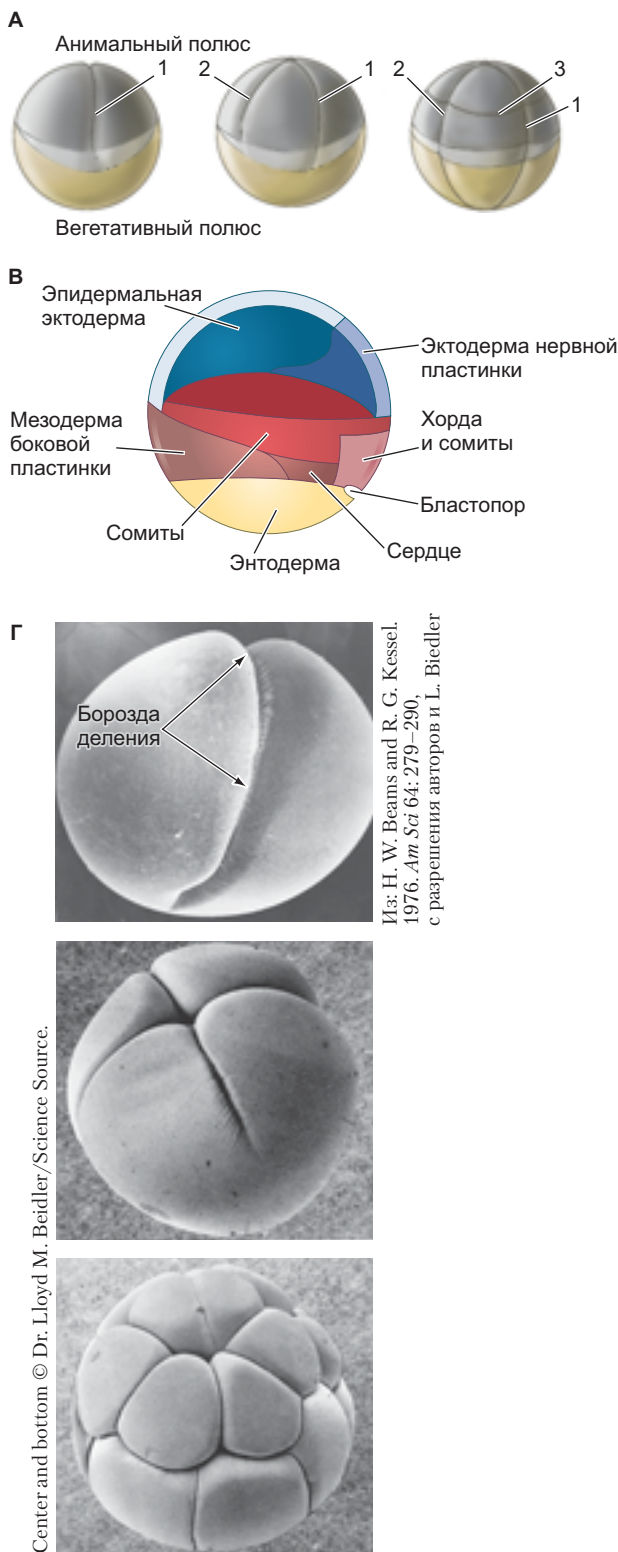
клеток, обычно называют **морулой** (от лат. «шелковица», форму которой он напоминает). На стадии 128 клеток бластоцель становится ярко выраженным, и с этого момента эмбрион принято считать **бластулой** (рис. 11.3Б).

Бластоцель амфибии выполняет несколько функций, одна из которых — предотвращение преждевременного взаимодействия клеток под ним с клетками, расположенными над ним. Когда Ньюкуп (1973) взял эмбриональные клетки тритона с крыши бластоцели на анимальном полушарии (эту область часто называют **анимальной шапочкой**) и пересадил их к полным желтка вегетативным клеткам в основании бластоцели, то клетки анимальной шапочки дифференцировались в мезодермальную ткань, а не эктодерму. Таким образом, бластоцель предотвращает преждевременный контакт клеток вегетативного полюса с клетками анимального полюса и дифференцировку клеток анимальной шапочки. Хотя развитие амфибий различается от вида к виду (Hurtado and De Robertis, 2007; Elinson and del Pino, 2012), в основном клетки анимального полушария дают начало эктодерме, а вегетативного — энтодерме, в то время как клетки под крышей бластоцели станут мезодермой (рис. 11.3В). Клетки напротив точки проникновения сперматозоида образуют нейроэктодерму, мезодерму хорды и глоточную (головную) энтодерму (Keller, 1975, 1976; Landström and Løvtrup, 1979).

Переход к средней бластуле: подготовка к гастрюляции

Важное предварительное условие гастрюляции — активация зиготического генома (т. е. генов в каждом ядре клеток эмбриона). Во время раннего дробления у *Xenopus laevis*, по-видимому, происходит транскрипция всего нескольких генов. По большей части ядерные гены не активируются до конца 12-го клеточного цикла (Newport and Kirschner, 1982a, b; Yang et al., 2002). В это время эмбрион претерпевает переход к средней бластуле, или **mid-blastula transition** (MBT), и, поскольку разные гены начинают транскрибироваться в разных клетках, у клеточного цикла появляется фаза G₁, а бластомеры приобретают способность становиться подвижными. Предполагается, что некий фактор в яйцеклетке адсорбируется новообразованным хроматином, потому что, как и в случае *Drosophila* (и, как вы узнаете позднее, у *Danio*), можно экспериментально изменить время этого перехода путем изменения соотношения количества хроматина и цитоплазмы в клетке (Newport and Kirschner, 1982a, b).

Считается, что после того как хроматин был ремоделирован в эухроматическое состояние (более открытое), различные транскрипционные факторы (такие как белок VegT, образовавшийся в вегетативной



цитоплазме из расположенной в ней же материнской мРНК) связываются с промоторами и иницируют новую транскрипцию. Например, клетки вегетативного полюса (под влиянием белка VegT) образуют энтодерму и начинают секретировать факторы, которые побуждают клетки над ними становиться мезодермой (см. рис. 11.12).

Рис. 11.3. Дробление яйцеклетки шпорцевой лягушки. **А.** Первые три борозды дробления пронумерованы в порядке появления. Поскольку присутствие желтка на вегетативном полюсе затрудняет дробление, второе деление начинается на анимальной стороне яйца, до того как первое деление полностью разделит вегетативную цитоплазму. Третье деление смещено к анимальному полюсу. **Б.** В ходе дробления на вегетативном полушарии оказывается меньшее число более крупных бластомеров, нежели на анимальном полюсе. На последнем рисунке показано поперечное сечение эмбриона на стадии средней бластулы. **В.** Карта презумптивных зачатков эмбриона *Xenopus*, наложенная на среднюю бластулу. **Г.** Фотографии, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии, иллюстрируют первое, второе и четвертое деления дробления. Обратите внимание на различия в размерах клеток анимального и вегетативного полюсов после третьего деления. (Рис.: А, Б из: В. М. Carlson, 1981. *Patten's Foundations of Embryology*. McGraw-Hill, New York; рис. В из: М. С. Lane and W. C. Smith, 1999. *Development* 126: 423–434 and C. S. Newman and P. A. Krieg, 1999. Из: *Cell Lineage and Fate Determination*, S. A. Moody [Ed.], pp. 341–351. Academic Press: New York.)

Гастрuliaция амфибий

Изучение гастрuliaции у амфибий — одно из старейших и одновременно одно из новейших направлений экспериментальной эмбриологии (Beetschen, 2001; Braukmann and Gilbert, 2005). За последние два десятилетия было пересмотрено большинство наших теорий, касающихся механизмов гастрuliaции и спецификации осей. Изучение гастрuliaционных движений было осложнено тем фактом, что у амфибий нет единого способа прохождения гастрuliaции; разные виды используют разные средства для достижения одной и той же цели. В последние годы наиболее интенсивные исследования были сосредоточены на *Xenopus laevis*, поэтому мы остановимся на механизмах гастрuliaции именно у этого вида.

Перед бластулами амфибий встают те же задачи, что и перед бластулами беспозвоночных, о которых мы узнали в гл. 8–10: нужно привести внутрь эмбриона те области, которые предназначены для формирования энтодермальных органов; окружить зародыш клетками, способными к образованию эк-

тодермы, и поместить между ними мезодермальные клетки в надлежащие места. В отличие от гастрюляции морского ежа, многие движения клеток и тканей при гастрюляции *Xenopus* происходят одновременно. Несмотря на это мы все еще можем выделить различные типы движений, которые возникают во время гастрюляции *Xenopus* (рис. 11.4):

1. Эпибolia: истончение клеток анимальной шапочки и их распространение по вегетативному полушарию, обусловленное пролиферацией и радиальной интеркаляцией.
2. Вегетативная ротация: клетки вегетативного полюса асимметрично прижимаются к внутренней крыше бластоцеля на дорсальной стороне.
3. Формирование бутылковидных клеток и инвагинация: локализованное апикальное сокращение на дорсальной губе бластопора создает анизотропные силы, которые способствуют инвагинации.
4. Инволюция и клеточная миграция: передний край инвагинирующих клеток ползет на крышу бластоцеля.
5. Конвергенция и удлинение: целенаправленная латерально-медиальная интеркаляция клеток по средней линии (конвергенция) приводит к растяжению передне-задней оси (удлинение).

Эпибolia проспективной эктодермы

Эпидермис — внешний слой нашей кожи, покрывает все тело, происходит из эктодермы, которая первоначально находилась исключительно в анимальном полушарии. Именно благодаря эпиболическим гастрю-

ляционным движениям эктодерма распространилась по остальной части зародыша, и одним из последствий этого процесса стало создание эпидермального покрытия (рис. 11.5А). В основе эпиболлии лежит два важных механизма: увеличение числа клеток (путем деления) и, одновременно с этим, интеграция нескольких глубоких слоев клеток в верхние слои (посредством радиальной интеркаляции) (Keller and Schoenwolf, 1977; Keller and Danilchik, 1988; Saka and Smith, 2001; Szabó et al., 2016). Поверхностная эктодерма толщиной в три-четыре клеточных слоя утоньшается всего до двух слоев плоских клеток (рис. 11.5Б). Клетки из более глубокого слоя направляют свои отростки в радиальном направлении к поверхностному слою клеток, а затем между более поверхностными клетками, что вызывает увеличение площади эктодермы (рис. 11.5В). Именно радиальная интеркаляция глубоких клеток эктодермы становится толкающей силой всей эктодермы, расширяя этот слой вегетативно над энтодермой.

Вегетативная ротация и инвагинация бутылковидных клеток

В то время как эпибolia расширяет эктодерму на вегетативном полушарии, мезодерма и энтодерма активно движутся внутри зародыша. Этот процесс коррелирует с индукцией мезодермы, а также впоследствии приводит к тому, что энтодерма инвагинирует с образованием эмбриональной, или первичной, кишки (так называемого **архентерона**). Процесс требует потери устойчивости поверхностного эпителия

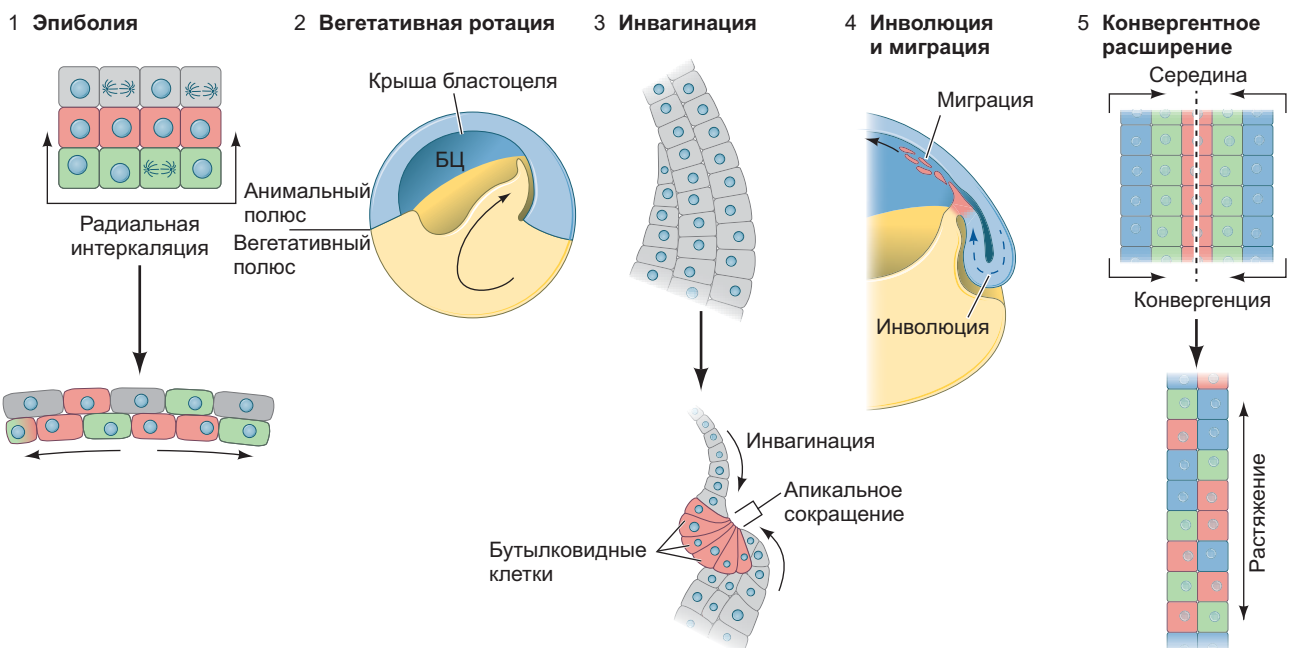


Рис. 11.4. Основные гастрюляционные движения зародыша шпорцевой лягушки

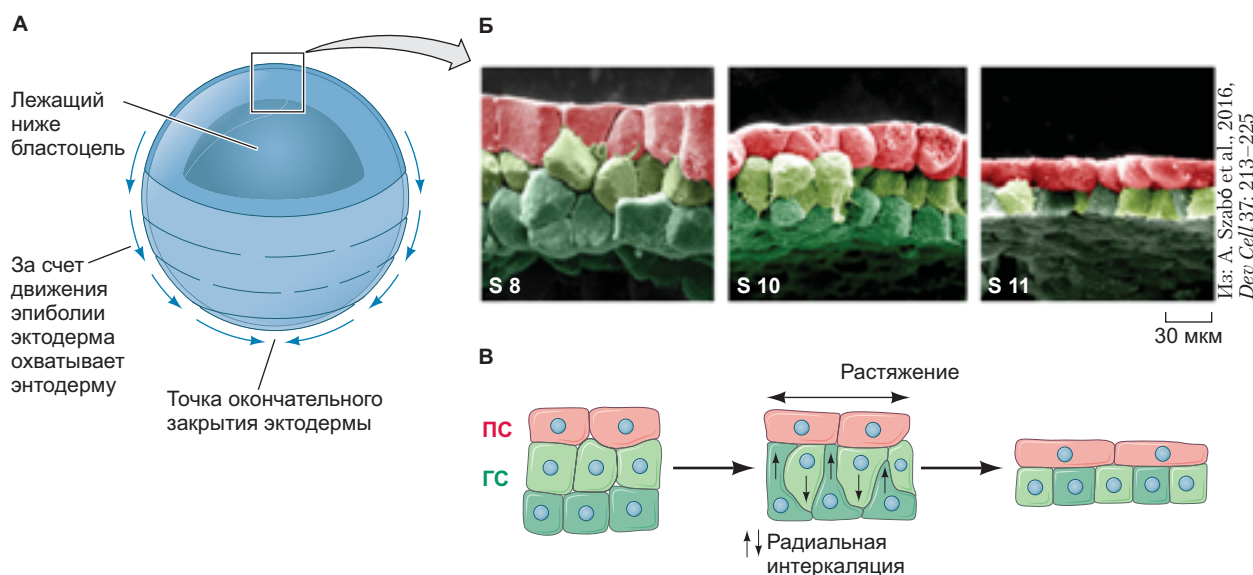


Рис. 11.5. Радиальная интеркаляция эктодермы в некоторой мере движет эпителией. **А.** Схема движений эпителии эктодермального слоя (обозначена синим цветом). Эктодерма постепенно продвигается к вегетативному полюсу, стремясь полностью охватить энтодерму. **Б.** Фотографии крыши бластоцеля шпорцевой лягушки (черная рамка на рис. А), полученные при помощи сканирующего электронного микроскопа, показывают изменения в форме и расположении клеток во время радиальной интеркаляции. Стадия 8 (S 8) — бластула; стадии 10 и 11 (S 10 и S 11) представляют собой более позднюю стадию гастрюлы. **В.** Схематичное изображение крыши бластоцеля на тех же этапах, что и на рис. Б. ПС — поверхностный слой; ГС — глубокий клеточный слой. (Рис. А и В из: A. Szabó et al., 2016. *Dev Cell* 37: 213–225.)

в точке инвагинации. Наиболее важно то, что инвагинация начинается на будущей дорсальной стороне зародыша, чуть ниже экватора, в области серого серпа (т. е. в области, противоположной точке проникновения сперматозоида; см. рис. 11.2В). В этом месте клетки инвагинируют с образованием щелевидного **бластопора**, и, следовательно, на дорсальной стороне зародыша эту область называют **дорсальной губой бластопора**. Формированию дорсальной губы бластопора способствует то, что эпителиальные клетки принимают форму, напоминающую бутылку или колбу (рис. 11.6А, Б). Основная часть каждой такой клетки смещается к внутренней части эмбриона, сохраняя контакт с внешней поверхностью с помощью тонкой шейки (см. рис. 11.4; шаг 3). Как и у морского ежа, бутылковидные клетки инициируют образование архентерона. Однако, в отличие от иглокожих, гастрюляция у лягушки начинается не в самой вегетативной области, а в **краевой зоне** — области, окружающей экватор бластулы, где встречаются анимальное и вегетативное полушария (рис. 11.6А).

Тем не менее формирование дорсальной губы бластопора не первое событие гастрюляции. По меньшей мере за 2 ч до формирования бутылковидных клеток клетки дна бластоцеля смещаются вверх по направлению к анимальной шапочке, и одновременно с этим траектория их движения закручивается в направлении презумптивной дорсальной стороны

ранней гастрюлы. Это движение называют **вегетативной ротацией** (см. рис. 11.4), и оно размещает предполагаемые клетки глоточной энтодермы рядом с бластоцелью и непосредственно над подворачивающимися клетками, которые будут давать начало мезодерме (рис. 11.7). Комбинация энтодермальных и мезодермальных клеток (так называемая **энтomezодерма**) затем мигрирует вдоль базальной поверхности крыши бластоцеля, продвигаясь к будущей передней части эмбриона (рис. 11.6Б–Д; Nieuwkoop and Florschütz, 1950; Winklbauer and Schürfeld, 1999; Ibrahim and Winklbauer, 2001).

Инволюция на губе бластопора

Когда мигрирующие маргинальные клетки достигают края бластопора, они подворачиваются внутрь и перемещаются по внутренней поверхности эктодермальных клеток анимального полушария (т. е. крыши бластоцеля). Поведение ткани, заворачивающейся внутрь и распространяющейся по внутренней поверхности (часто по самой себе), называют **инволюцией** (вворачиванием), а клетки с таким поведением в гастрюле амфибии, часто называют **клетками вворачивающейся краевой зоны (ВКЗ)** (см. рис. 11.6Г–Д). Важно отметить, что слои эктодермы и основной энтomezодермы (или, иначе, мезенто-

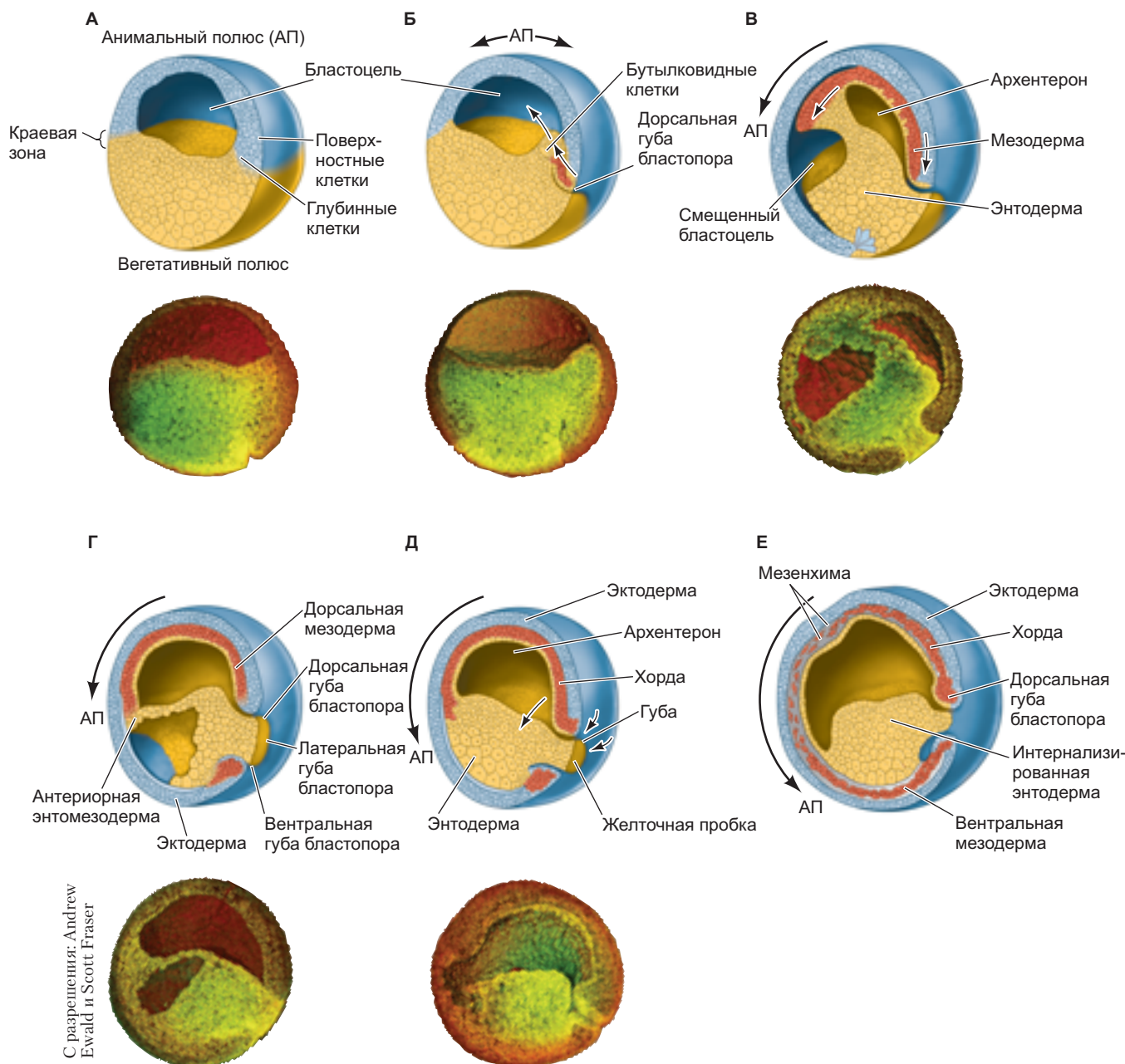


Рис. 11.6 Движения клеток во время гастрюляции у лягушки. Показаны меридиональные срезы через центр зародыша и обращенные вегетативным полюсом в сторону наблюдателя со смещением влево. Основные движения клеток обозначены стрелками, а поверхностные клетки анимального полушария окрашены, чтобы легко проследить их движения. Ниже на рисунках представлены соответствующие микрофотографии, полученные с помощью микроскопии для визуализации поверхности (Ewald et al., 2002). **А, Б.** Ранняя гастрюла. Бутылковидные клетки у края перемещаются внутрь, образуя дорсальную губу блястопора, а мезодермальные предшественники инволюируют под крышу блястоцеля. Положение анимального полюса (АП) на рисунке будет меняться по ходу гастрюляции. **В, Г.** Средняя гастрюла. Образуется архентерон, смещающий блястоцель, клетки из боковых и вентральных губ блястопора мигрируют в зародыш. Клетки анимального полушария мигрируют вниз к вегетативной области, перемещая блястопор в область около вегетативного полюса. **Д, Е.** К концу гастрюляции блястоцель практически исчезает, зародыш покрывается эктодермой, энтодерма интернализуется, а мезодермальные клетки оказываются между эктодермой и энтодермой. (Рисунки по данным: R. E. Keller, 1986. Из: *Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis*, Vol. 2, L. Browder [Ed.], pp. 241–327. Plenum: New York.)

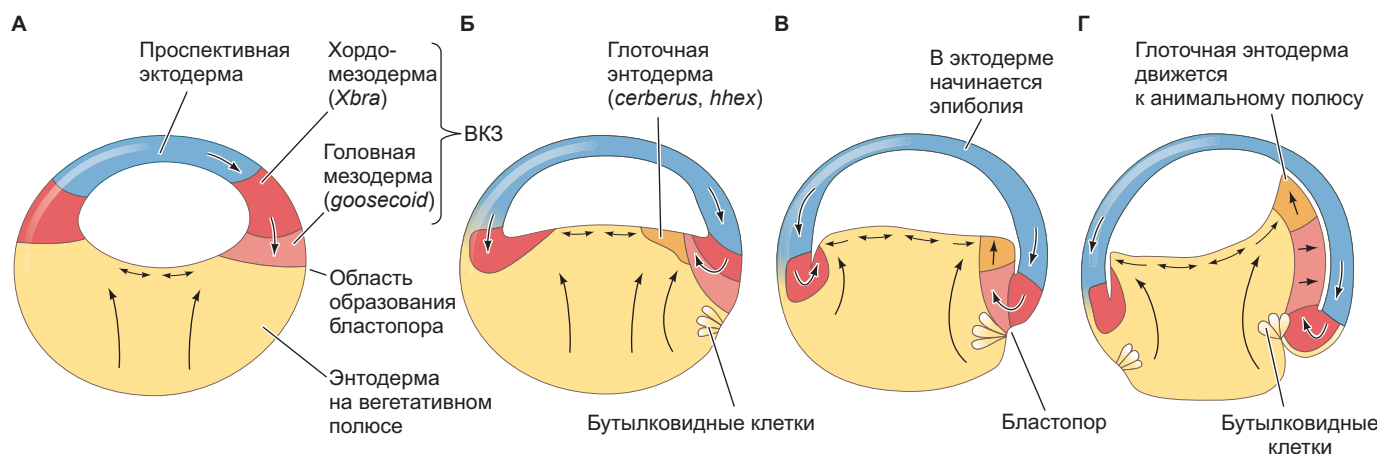


Рис. 11.7. Ранние гастрюляционные движения в развитии шпорцевой лягушки. **А.** В начале гастрюляции формируется вворачивающаяся краевая зона (ВКЗ). Розовым отмечена презумптивная головная мезодерма (о чем свидетельствует экспрессия *goosecoid*), а хордомезодерма (экспрессирует *Xbra*) — красным. **Б.** Вегетативная ротация (стрелки) толкает презумптивную глоточную энтодерму (показана оранжевым; характеризуется экспрессией *hhx* и *cerberus*) в сторону бластоцеля. **В, Г.** Движения вегетативной энтодермы (показана желтым) толкают глоточную энтодерму вперед, пассивно продвигая мезодерму внутрь зародыша к анимальному полюсу. В эктодерме (показана синим) начинается эпиволия. (По данным: R. Winklbauer and M. Schürfeld, 1999. *Development* 126: 3703–3713.)

дермы) остаются разделенными благодаря узкому пространству внеклеточного матрикса, называемого **щелью Браше** (Gorny and Steinbeisser, 2012). Первыми клетками ВКЗ, составляющими дорсальную губу бластопора и вместе с тем инволюирующими в зародыш, являются клетки проспективной глоточной энтодермы передней кишки. Подворачивающуюся массу клеток возглавляют глубокие энтодермальные клетки, изменившие свое положение в результате вегетативной ротации (см. рис. 11.7). Эти клетки совместно мигрируют в anteriорном направлении под поверхностной эктодермой бластоцеля (Papan et al., 2007a, b; Winklbauer and Damm, 2012; Moosmann et al., 2013). В клетках передней энтодермы происходит транскрипция гена *hhx*, кодирующего транскрипционный фактор, необходимый для формирования головы и сердца (Rankin et al., 2011). По мере того как первые клетки проникают внутрь эмбриона, дорсальная губа бластопора образуется из вворачивающихся в зародыш клеток, которые впоследствии формируют **прехордальную пластинку**, зачаток головной мезодермы. В клетках прехордальной пластинки происходит транскрипция гена *goosecoid*. Его продукт — фактор транскрипции, активирующий многочисленные гены, которые контролируют формирование головы. Активация достигается косвенно, путем репрессии генов, подавляющих развитие головы (например, *Wnt8*). Это явление активации генов путем репрессии их репрессоров, так называемая двойная отрицательная связь, рассмотренная нами при изучении спецификации микромеров морского ежа (см. гл. 10), — основная особенность развития животных.

Следующими в очереди на вворачивание через дорсальную губу бластопора стоят клетки **хордомезодермы**. Они образуют **хорду**, временный мезодермальный стержень, играющий важную роль в стимуляции развития нервной системы и ее разметке. Клетки хордомезодермы экспрессируют ген *tbxt* (*brachyury*), продуктом которого является фактор транскрипции, строго необходимый для образования хорды (см. гл. 10). Таким образом, состав дорсальной губы бластопора постоянно меняется, поскольку первоначальные клетки мигрируют внутрь эмбриона и заменяются другими клетками, мигрирующими сначала вниз, затем внутрь и вверх.

Когда новые клетки попадают в зародыш, бластоцель смещается в сторону, противоположную дорсальной губе. Между тем губа расширяется по бокам и в вентральном направлении, поскольку вокруг бластопора продолжается образование и инволюция бутылковидных клеток. У расширяющегося «серпа» бластопора появляются латеральные губы и, в конце концов, вентральная губа, по которой проходят другие клетки-предшественники мезодермы и энтодермы (рис. 11.8). Среди этих клеток присутствуют предшественники сердца и почек. С образованием вентральной губы внутри кольцевидного бластопора оказываются крупные энтодермальные клетки, которые остаются открытыми на поверхности вегетативного полюса. Оставшийся участок энтодермы называют **желточной пробкой**; в конце концов он рассасывается (на месте образования ануса). На этом этапе все энтодермальные предшественники уже проникли внутрь эмбриона, эктодерма охватывает поверхность, а мезодерма оказалась между ними.

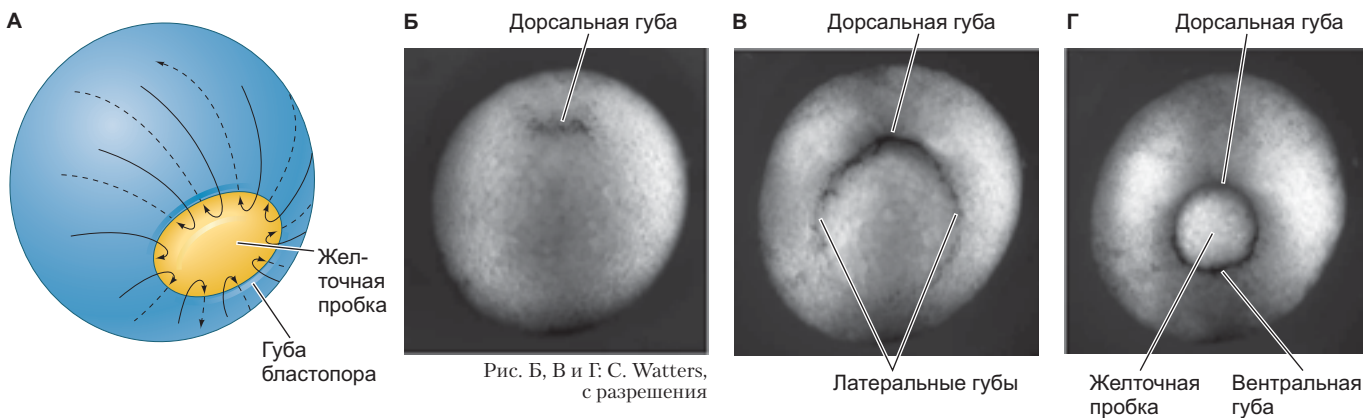


Рис. 11.8. Формирование губ бластопора у *Xenopus laevis*. **А.** Эпибolia эктодермы (показана синим) происходит одновременно с тем, как клетки энтодермы (показана желтым), наполненные желтком, и мезодерма вворачиваются в зародыш. **Б–Г.** Вид на зародыш с вегетативного полюса. **Б.** Место образования дорсальной губы бластопора заметно по пигментированным клеткам на ее краях, приходящим из анимальной шапочки. **В.** Зона инволюции распространяется, формируя латеральные губы. **Г.** В итоге бластопор окружает маленькую желточную пробку, вокруг которой инволюируют клетки. Эти события длятся около 7 ч

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Фибронектиновый путь для коллективной миграции вворачивающейся мезентодермы

Как нам при ходьбе необходима твердая поверхность, так и клетки зародыша нуждаются в стабильном субстрате для выполнения многих гастрюляционных движений. Такой субстрат в гастрюле *Xenopus* создается путем сборки фибронектиновых фибрилл во внеклеточном матриксе, лежащем под крышей бластоцеля. Похоже, что у шпорцевой лягушки и многих других амфибий инволюирующие мезентодермальные предшественники мигрируют к анимальному полюсу по внеклеточной сети **фибронектина (ФН)**, образуемой презумптивными эктодермальными клетками крыши бластоцеля (**рис. 11.9А**). Потеря ФН или его фибриллярных структур приводит к остановке инволюции и неспособности завершить эпиболию (Boucaut et al., 1984; Rozario et al., 2009).

Если фибронектин — это дорога, то как по ней движется клеточный слой? Вы когда-нибудь были свидетелями скоростных гонок? Будь то 5К или любой другой марафон, лучшие бегуны всегда оказываются впереди остальных. Ведущие бегуны заслужили свое место среди лучших и считаются наиболее подготовленными к гонке. А теперь представьте, что было бы, если в толпе бегунов все будут держаться за футболки впереди бегущих. Это заставило бы, бегунов объединиться в один коллектив. Если представить, что бегуны — это клетки, такой тип группового поведения называют **коллективной миграцией клеток** (рис. 11.9Б).

Можете себе представить, какая сила прикладывается к клеткам в самом начале этой толпы?

Недавно движение клеток ВКЗ во время гастрюляции *Xenopus* было охарактеризовано как коллективная миграция популяции клеток (Sonavane et al., 2017). Похоже, что инволюирующие клетки энтодермы плотно сцеплены друг с другом, причем поведение ведущего ряда отличается от других рядов, которые он тянет за собой. Лидирующий ряд проявляет явную поляризованную Рас-активность одновременно с образованием ламеллоподий вдоль переднего края. Ламеллоподии лидирующего края необходимы для миграции клеток (см. рис. 11.9Б). Используя микроскопию силы тяги, исследователи продемонстрировали, что лидирующий край клеток в передней части «толпы» представляет собой только мигрирующие клетки, которые проявляют «тяговые напряжения» (**рис. 11.10А**). Это означает, что только ведущие клетки фактически прикреплены к внеклеточному матриксу (фибриллам ФН) крыши бластоцеля и прикладывают истинные силы тягового типа. Как вы поняли из нашей более ранней аналогии, сила, воздействующая на ведущий ряд клеток, огромна и даже приводит к расширению щели Браше сразу за ведущими клетками (рис. 11.10Б). Впоследствии в ведущих клетках обнаружили специализированные кадгерин-кератиновые комплексы промежуточных филаментов, которые служат для противостояния силе натяжения от следующих рядов. Есть сообщение также о наличии цитонемоподобных филоподиальных выпячиваний (см. гл. 4), простирающихся в щель Браше (рис. 11.10Б; Sonavane et al., 2017). Какую роль цитонемы играют в гастрюляции или определении оси, пока неизвестно.

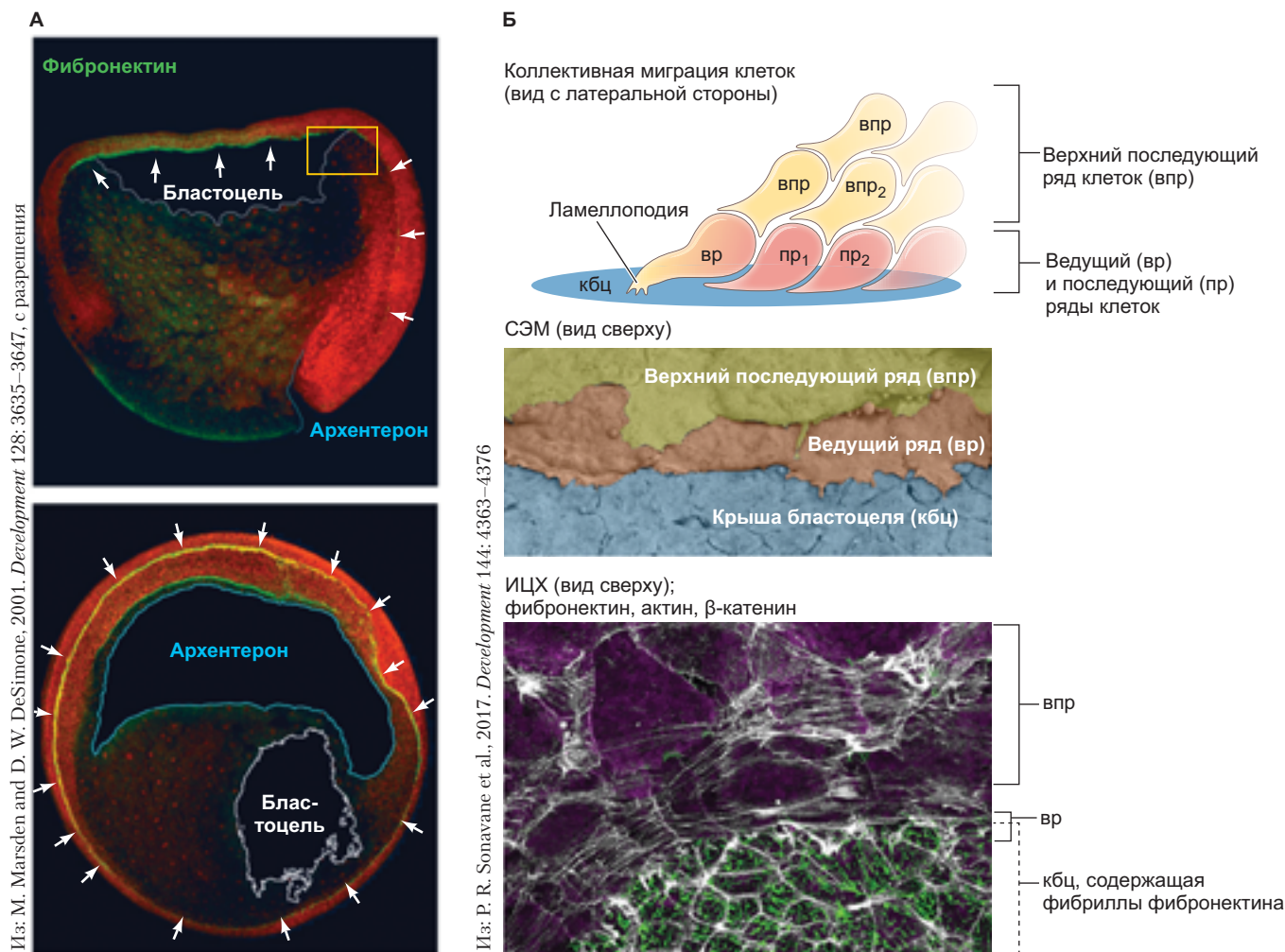


Рис. 11.9. Фибронектин и гаструляция амфибий. **А.** Сагиттальный срез зародыша шпорцевой лягушки на стадии ранней (вверху) и поздней (внизу) гаструляции. Сеть фибронектина на крыше бластоцеля окрашена с помощью флуоресцентных антител (показаны зеленым и желтым, стрелки), а клетки эмбриона отмечены красным цветом. Бластоцель (бц) очерчен белым контуром, а архентерон — бирюзовой линией. **Б.** Клетки ВКЗ при большом увеличении (область в желтой рамке на рис. А) на схематичном изображении в боковой проекции (сверху) и на фотографиях (вид сверху), полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ; окрашенное изображение; посередине) и иммуноцитохимии (ИЦХ; снизу). Ведущий ряд клеток применяет тяговую силу на фибронектиновый матрикс крыши бластоцеля (кбц) одновременно с тем, как его тянут последующие мезендодермальные клетки. Ведущие клетки — единственные клетки среди коллективно мигрирующих, для которых характерно образование ламеллоподий (на нижнем рисунке актиновые микрофиламенты показаны белым цветом)

Конвергентное удлинение дорсальной мезодермы

На рис. 11.11 показано поведение клеток вворачивающейся краевой зоны на последовательных стадиях гаструляции *Xenopus* (Keller and Schoenwolf, 1977; Hardin and Keller, 1988). Изначально ВКЗ имеет толщину в несколько клеточных слоев. Незадолго до инволюции через губу бластопора несколько слоев глубоких клеток ВКЗ подвергаются радиальной интеркаляции, вследствие чего клеточный слой утоньшается и удлиняется. Интеркаля-

ция дополнительно удлиняет ВКЗ (рис. 11.11А). В то же время площадь поверхностных клеток увеличивается за счет их деления и уплощения. Когда глубокие клетки достигают губы бластопора, они инволюируют в зародыш и инициируют интеркаляцию второго типа. Интеркаляция вызывает конвергентное удлинение вдоль медиолатеральной оси, при этом несколько мезодермальных потоков объединяются в один, образуя длинную узкую полосу (рис. 11.11Б). Передняя часть полосы мигрирует к анимальной шапочке. Таким образом, мезодермальный поток продолжает мигрировать

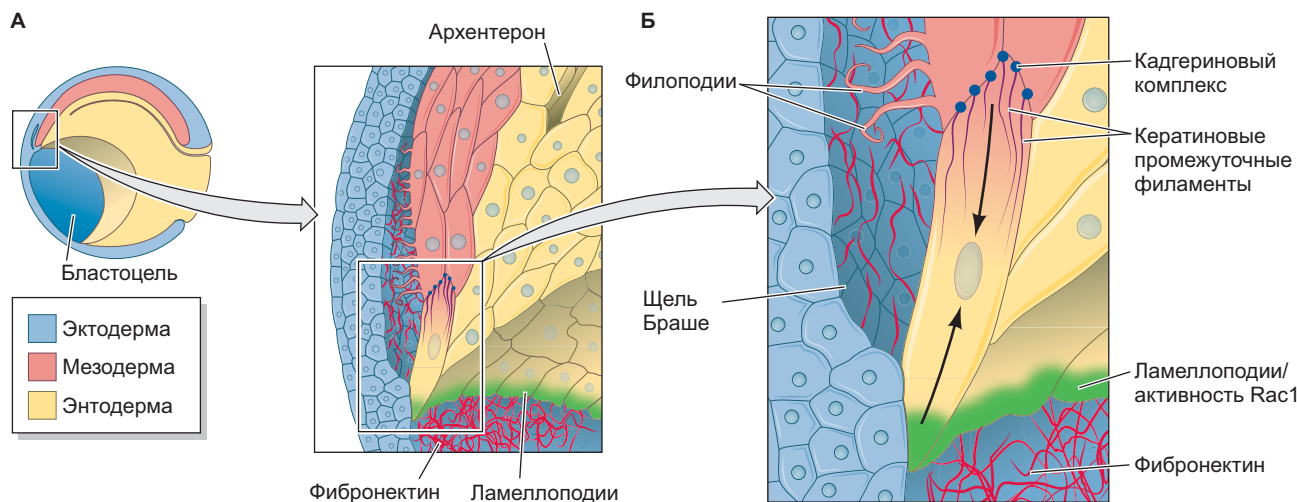


Рис. 11.10. Коллективная миграция клеток инволюирующей мезентодермы. Обратитесь к первоисточнику, для того чтобы узнать подробности. (Из: P. R. Sonavane et al., 2017. *Development* 144: 4363–4376.)

в направлении анимального полюса, увлекая за собой лежащий над ним слой поверхностных клеток (включая бутылковидные), пассивно тянущийся к анимальному полюсу, формируя энтодермальную крышу архентерона (см. рис. 11.6 и 11.11А). Повидимому, радиальная и медиолатеральная интеркаляции клеток глубокого слоя отвечают за продолжающееся движение мезодермы внутрь зародыша.

Вероятно, группа сил управляет конвергентным удлинением, включая следующие (но не ограничиваясь ими): связанность поляризованных клеток посредством Wnt-пути/планарной клеточной полярности (planar cell polarity, PCP), избирательной адгезии, опосредованной кадгерином и волнами ионов Ca^{2+} (Shindo and Wallingford, 2014; Shindo, 2017; Shindo et al., 2019).

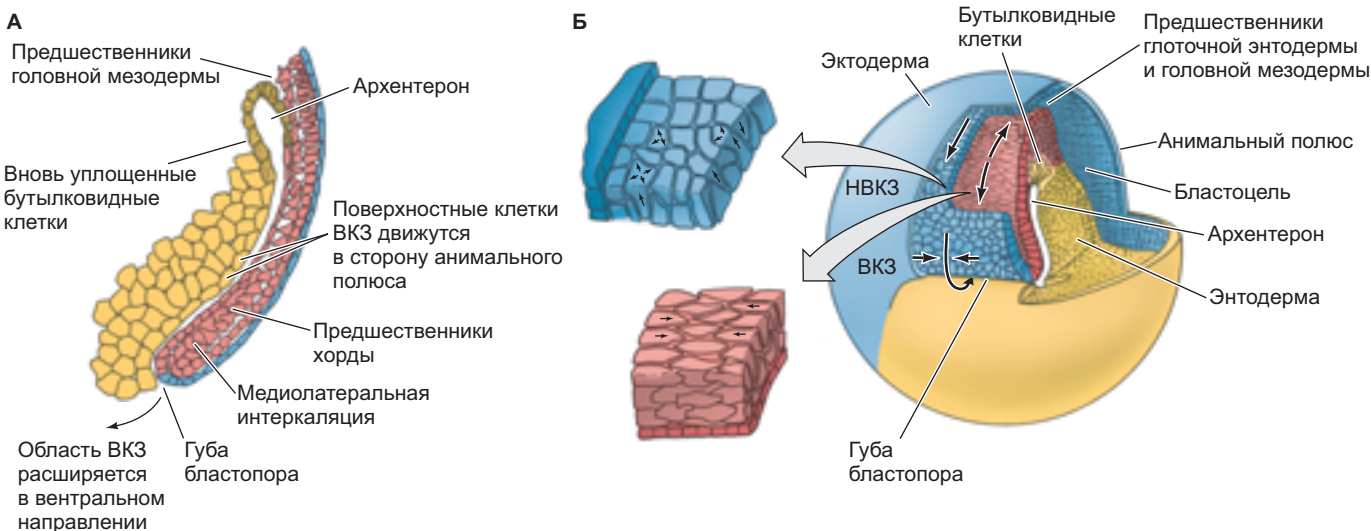


Рис. 11.11. Гастрюляция шпорцевой лягушки продолжается. **А.** Глубинные маргинальные клетки сплюсчиваются, а бывшие поверхностные клетки образуют теперь стенку архентерона. **Б.** Радиальная интеркаляция, вид сверху на дорсальную губу бластопора с дорсальной поверхности. В невворачивающейся краевой зоне (НВКЗ) и верхней части ВКЗ глубинные (мезодермальные) клетки радиально интеркалируют, образуя тонкую полосу уплотненных клеток. Истончение слоев вызывает конвергентное расширение (белые стрелки) в сторону губы бластопора. Непосредственно над губой напряжения, вызванные медиолатеральной интеркаляцией клеток, перетягивают ВКЗ через губу. После прохождения инволюции на губе бластопора медиолатеральная интеркаляция продолжается, удлиняя и сужая осевую мезодерму. (По данным: P. Wilson and R. Keller, 1991. *Development* 112: 289–300; R. Winklbauer and M. Schürfeld, 1999. *Development* 126: 3703–3713.)

? Загадки развития

Во время коллективной миграции клетки ВКЗ протягивают длинные цитонемы в щель Браше. Представьте, что вы скользите по воде в каное, протягиваете руки и пальцами касаетесь воды. Это создает рябь на воде, распространяющуюся в трех измерениях, передавая своего рода физический сигнал. Похожи ли цитонемы клеток ВКЗ на ваши пальцы, когда они касаются поверхности вышележащей эктодермы при коллективной миграции через крышу бластоцеля? Какой сигнал они могут передавать? Ответы на эти вопросы в настоящее время неизвестны, но могут глубоко изменить наше понимание того, как достигается детерминация оси.

Мезодермальные клетки, входящие через дорсальную губу бластопора, дают начало дорсальной осевой мезодерме (хорда и сомиты), тогда как остальная мезодерма туловища (формирующая сердце, почки, кости и части некоторых других органов) входит через вентральную и латеральные губы, образуя мезодермальную мантию. Энтодерма происходит от поверхностных клеток вворачивающейся краевой зоны, которые образуют выстилку крыши архентерона, и от суббластопоральных вегетативных клеток, которые становятся дном архентерона (Keller, 1986). Остаток бластопора, где энтодерма встречается с эктодермой, становится анусом. Как остроумно заметил эксперт по гастрюляции Рэй Келлер: «Гастрюляция — это время, когда позвоночное животное вынимает свою голову из ануса».

Прогрессивная детерминация осей тела амфибий

Как мы уже видели, неоплодотворенное яйцо амфибии поляризовано относительно анимально-вегетативной оси, и зародышевые листки могут быть размечены на ооците еще до оплодотворения. Бластомеры анимального полушария становятся клетками эктодермы (эпидермис и нервы), клетки вегетативного полушария становятся внутренней выстилкой кишки и связанных с ней органов (энтодерма), а клетки на экваторе образуют мезодерму (кости, мышцы, сердце, кровь, почки и т. д.).

Спецификация зародышевых листков

Считается, что общую судьбу различных областей зародыша сообщают эмбриону вегетативные клетки, которые выполняют две основные функции: 1) дифференцируются в энтодерму; 2) индуцируют клетки, располагающиеся непосредственно над ними, стать мезодермой.

Эта «восходящая» спецификация зародыша лягушки обусловлена набором мРНК, связанных с вегетативным кортексом. Он включает мРНК, необходимые для синтеза фактора транскрипции VegT, который распределяется между вегетативными клетками во время дробления. Фактор VegT имеет решающее значение в формировании как энтодермальных, так и мезодермальных клеточных линий. Если транскрипты VegT разрушить с помощью антисмысловых олигонуклеотидов, весь эмбрион становится эпидермисом без образования мезодермальных или энтодермальных тканей (Zhang et al., 1998; Taverner et al., 2005). Транскрипция мРНК гена *VegT* начинается вскоре после оплодотворения. Его продукт поддерживает активность определенного набора генов до перехода к средней бластуле. Один из генов, активируемых белком VegT, кодирует транскрипционный фактор Sox17. В свою очередь, Sox17 критически необходим для активации генов, которые специфицируют клетки по энтодермальному пути. Таким образом, предназначение вегетативных клеток — стать энтодермой.

Другой набор ранних генов, активируемых VegT, кодирует паракринные факторы Nodal, которые инструктируют клеточные слои над ними стать мезодермой (Skirkanich et al., 2011). Секретируемый в зарождающейся среди вегетативных клеток энтодерме Nodal сигнализирует клеткам, находящимся над ними, о накоплении фосфорилированного Smad2. Фосфорилированный Smad2 помогает усилить регуляцию в этих клетках генов *eomesodermin* и *Brachyury* (*tbxt*), белковые продукты которых вызывают спецификацию по мезодермальному пути. Белки Eomesodermin и Smad2, работая вместе, могут активировать зиготические гены для белков VegT, создавая тем самым положительную петлю прямой связи, которая критически важна для поддержания мезодермы (рис. 11.12). В отсутствие такой индукции клетки становятся эктодермой (Fukuda et al., 2010).

Помимо этого, транслируется мРНК гена *Vg1*, накопленная в вегетативной цитоплазме. Продукция Vg1 (другого Nodal-подобного белка) необходима для активации других генов в дорсальной мезодерме. Если передачу сигналов Nodal или Vg1 заблокировать, можно наблюдать слабую индукцию мезодермы или ее отсутствие (Kofron et al., 1999; Agius et al., 2000; Birsoy et al., 2006). Таким образом, к концу поздней стадии бластулы специфицируются все основные зародышевые листки. Вегетативные клетки специфицируются по энтодермальному пути с помощью транскрипционных факторов, таких как Sox17. Экваториальные клетки специфицируются по мезодермальному пути за счет факторов транскрипции, таких как Eomesodermin. А анимальная шапочка, которая еще не начала получать сигналы, становится эктодермой (рис. 11.12).

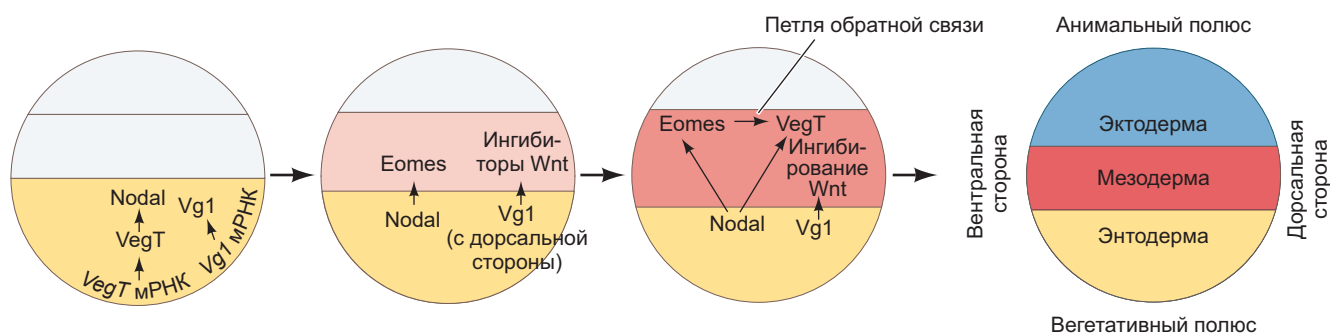


Рис. 11.12 Модель спецификации мезодермы. В вегетативной области ооцита накоплена мРНК для синтеза транскрипционного фактора VegT и мРНК для Nodal-подобного паракринного фактора Vg1 в будущей дорсальной области. На стадии поздней бластулы происходит трансляция мРНК Vg1, в свою очередь Vg1 индуцирует будущую дорсальную мезодерму к транскрипции генов для нескольких антагонистов Wnt (таких как Dickkopf). Кроме того, происходит трансляция VegT, а белок VegT активирует ядерные гены, кодирующие белки Nodal. Эти члены суперсемейства TGF β активируют экспрессию транскрипционного фактора под названием эомезодермин в презумптивной мезодерме. Эомезодермин с помощью Smad2, активированного белками Nodal, стимулирует экспрессию ядерных генов, кодирующих VegT. Таким образом, экспрессия VegT проходит путь от материнских мРНК в презумптивной энтодерме к ядерной экспрессии в презумптивной мезодерме. (По данным: M. Fukuda et al., 2010. *Int J Dev Biol* 54: 81–92.)

Дорсально-вентральная и передне-задняя оси

Хотя анимально-вегетативная полярность инициирует спецификацию зародышевых листков, передне-заднюю (антерио-постериорную), дорсально-вентральную и лево-правую оси определяют события, инициированные при оплодотворении, но не реализованные до гастрুলации. У шпорцевой лягушки (и у других земноводных) формирование антерио-постериорной и дорсально-вентральной осей неразрывно связаны. Как мы позже увидим, это основано на событиях оплодотворения, при которых фактор транскрипции β -катенин оказывается в области яйцеклетки напротив точки проникновения сперматозоида. Такое расположение и определяют, что эта область яйца станет дорсальной стороной эмбриона.

Как только β -катенин попадает в клетки данной области яйца, в них начинается экспрессия определенных генов, вследствие чего инициируется инволюция мезодермы. Это движение устанавливает антерио-постериорную ось эмбриона. Первые мезодермальные клетки, мигрирующие по дорсальной губе бластопора, будут стимулировать эктодерму над ними к образованию антериорных структур, таких как передний мозг; мезодерма, которая развивается позже, будет давать сигнал эктодерме к формированию более постериорных структур, таких как задний и спинной мозг. Процесс, в результате которого центральная нервная система образуется за счет взаимодействия с подлежащей мезодермой, был назван **первичной эмбриональной индукцией** и является одним из основных способов организации эмбрио-

нов позвоночных. Действительно, его первооткрыватели назвали дорсальную губу бластопора и ее производные **организатором**, обнаружив, что эта область отличается от всех других частей эмбриона. Эксперименты Ганса Шпемана и его учеников в Университете Фрайбурга в Германии поставили вопросы, ответы на которые экспериментальные эмбриологи искали на протяжении почти всего двадцатого столетия и в результате которых Шпеман был удостоен Нобелевской премии в 1935 г. (Hamburger, 1988; De Robertis and Aréchaga, 2001; Sander and Fässler, 2001).

Работа Ганса Шпемана и Хильды Мангольд: первичная эмбриональная индукция

Наиболее впечатляющие эксперименты по трансплантации, опубликованные Шпеманом и его докторантом Хильдой Мангольд в 1924 г., показали, что только у одной из всех тканей ранней гастролы назначение заранее предопределено. Этой самодифференцирующейся тканью является дорсальная губа бластопора — ткань, происходящая из цитоплазмы серого серпа, расположенного напротив точки проникновения сперматозоида. Когда эту ткань пересадили в область презумптивной кожи области живота другой гастролы, она не только продолжила оставаться дорсальной губой бластопора, но и инициировала гастрুলацию и эмбриогенез в окружающей ткани!

В этих экспериментах Шпеман и Мангольд использовали различно пигментированных зародышей

двух видов тритонов, темно пигментированных *Triturus taeniatus* и непигментированных *T. cristatus*, благодаря чему ученые могли различить ткани хозяина и донора по окраске. Когда дорсальную губу ранней гаструлы *T. taeniatus* имплантировали в область ранней гаструлы *T. cristatus*, которая должна была стать вентральным эпидермисом (наружным слоем кожи брюха), ткань дорсальной губы инвагинировала так же, как обычно (свидетельствуя о самодифференцировке), и исчезла, погрузившись под вегетативные клетки (рис. 11.13А). Затем пигментированная донорская ткань продолжала самодифференцироваться в хордодерму (хорду) и другие мезодермальные структуры, обычно образующиеся из дорсальной губы бластопора (рис. 11.13Б). По мере того как донорские мезодермальные клетки продвигались вперед, клетки хозяина приступали к образованию нового эмбриона, становясь органами, которые они никогда не формируют при нормальном развитии. В сомите вторичного эмбриона можно увидеть как пигментированные

(донорские), так и непигментированные ткани хозяина. Еще более поразительно то, что клетки дорсальной губы способны взаимодействовать с тканями хозяина, образуя завершленную нервную пластинку из эктодермы хозяина. В итоге вторичный зародыш формируется соединенным с основным зародышем «лицом к лицу» (рис. 11.13В). Результаты этих технически сложных экспериментов были многократно подтверждены и воспроизведены на многих видах амфибий, включая *Xenopus* (рис. 11.13Г, Е; Capuron, 1968; Gimlich and Cooke, 1983; Smith and Slack, 1983; Recanzone and Harris, 1985).

Шпеман назвал клетки дорсальной губы и их производные (хорду и головную энтодерму) **организатором**, так как, во-первых, они заставляют вентральные ткани хозяина изменить свой путь развития и образовать нервную трубку и дорсальную мезодермальную ткань (например, сомиты), и, во-вторых, они организуют ткани хозяина и донора во вторичный эмбрион с четкими антерио-постериорной и дорсаль-

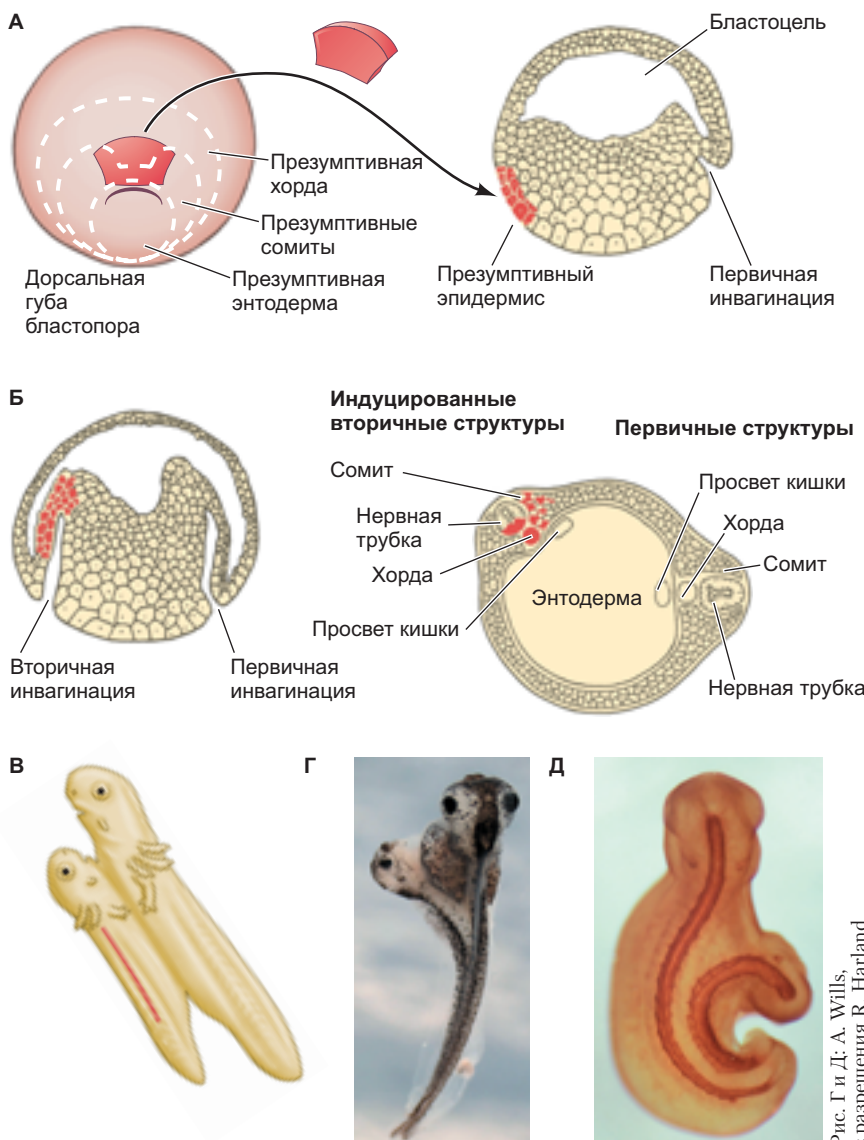


Рис. 11.13. Организация вторичной оси тканью дорсальной губы бластопора. Шпеман и Мангольд в экспериментах в 1924 г. проиллюстрировали этот процесс, используя по-разному пигментированных эмбрионов тритона. **А.** Участок ткани дорсальной губы, полученный из ранней гаструлы *Triturus taeniatus* пересаживают в ту область гаструлы *T. cristatus*, которая в норме образует вентральный эпидермис. **Б.** Донорская ткань инвагинирует и образует второй архентерон, а затем и вторую эмбриональную ось. В новой нервной трубке, хорде и сомитах можно наблюдать ткани как донора, так и хозяина. **В.** В итоге формируется второй зародыш, сросшийся с эмбрионом-хозяином. **Г.** Живые сдвоенные личинки шпорцевой лягушки, полученные путем трансплантации дорсальной губы бластопора в вентральную область эмбриона хозяина на стадии ранней гаструлы. **Д.** Такие же личинки-близнецы с окрашенной хордой; можно увидеть начальную и вторичную хорды. (Рис. А и В по данным: J. Holtfreter and V. Hamburger. 1955. Из: *Analysis of Development*, B. H. Willier, P. Weiss, and V. Hamburger [Eds.], pp. 230–296. W. B. Saunders Company: Philadelphia and London.)

но-вентральной осями. Он предположил, что в ходе нормального развития эти клетки «организуют» дорсальную эктодерму в нервную трубку и трансформируют боковую мезодерму в ткани антерио-постериорной оси тела (Spemann, 1938). В настоящее время известно (во многом благодаря Шпеману и его ученикам), что одного взаимодействия хордомезодермы и эктодермы недостаточно для «организации» всего эмбриона. Вероятнее всего, оно инициирует целую серию последовательных индуктивных событий. Поскольку в ходе эмбрионального развития их происходит много, ключевую индукцию, при которой потомки клеток дорсальной губы бластопора индуцируют вторичную ось и нервную трубку, принято называть **первичной эмбриональной индукцией**. Этот классический термин стал причиной путаницы, потому что индукцию образования нервной трубки хордой больше не считают первым индукционным процессом при формировании зародыша. Как мы уже видели, существуют индукционные события, предшествующие этой «первичной» индукции (см. рис. 11.12).

Молекулярные механизмы формирования осей земноводных

Эксперименты Шпемана и Мангольд показали, что дорсальная губа бластопора, наряду с дорсальной мезодермой и глоточной энтодермой, которые из нее образуются, представляют собой «организатор», способный инструктировать формирование зародышевых осей. Механизмы, с помощью которых образуется сам организатор и посредством которых он действует, оставались загадкой. Действительно, обычно говорят, что в исторической статье Шпемана и Мангольд было больше вопросов, чем ответов. Среди этих вопросов были следующие.

- Как организатор приобретает свои свойства? Что служит причиной того, что дорсальная губа бластопора отличается от любой другой области эмбриона?
- Благодаря секреции каких факторов организатор вызывает образование нервной трубки и создание антерио-постериорной, дорсально-вентральной и лево-правой осей?
- Каким образом происходит регионализация нервной трубки, вследствие которой ее крайняя передняя область дает органы чувств и передний мозг, а крайняя задняя — спинной мозг?

Описание организатора, данное Шпеманом и Мангольд, стало отправной точкой для одной из первых по-настоящему международных программ научных исследований (Gilbert and Saxén, 1993; Armon, 2012). Ученые из Великобритании, Германии, Франции, США, Бельгии, Финляндии, Японии и Советского Союза присоединились к поиску тех особенных веществ, которые могли бы обуславливать способности организатора. Росс Гренвилл Харрисон писал о га-

струле амфибии, что это новый Юкон, к которому сейчас спешат охотливые искатели, желая найти золото вокруг бластопора (Twitty, 1966). К сожалению, их первые кирки и лопаты не оказались достаточно острыми, чтобы обнаружить вовлеченные молекулы. Белки, ответственные за индукцию, находились в концентрациях, слишком малых для биохимических анализов, и большое количество желтка и липидов в яйце амфибии также препятствовало очистке белка (Grunz, 1997). Анализ молекул-организаторов пришлось отложить, пока метод рекомбинантных ДНК не помог исследователям клонировать кДНК из мРНК губы бластопора, что позволило им определить, какие из этих клонов кодируют факторы, дорсализирующие зародыш (Carron and Shi, 2016). Теперь мы можем ответить на каждый из поставленных выше вопросов по очереди.

Как образуется организатор?

Почему примерно дюжина первых клеток, образующих организатор, расположены ровно напротив точки проникновения сперматозоида и что так рано определяет их путь развития? Последние данные дают неожиданный ответ: эти клетки находятся в определенном месте в нужное время, в точке пересечения двух сигналов. Первый сигнал сообщает клеткам, что они дорсальные. Второй говорит о том, что эти клетки мезодермальные. Взаимодействие этих сигналов создает полярность в мезодерме, что является основой для возникновения организатора и для создания дорсально-вентральной полярности.

ДОРСАЛЬНЫЙ СИГНАЛ, ЧАСТЬ 1: ЦЕНТР НЬЮКУПА

Эксперименты Питера Ньюкупа и Осаму Накамура показали, что организатор получает свои особые свойства благодаря сигналам, исходящим от презумптивной энтодермы под ним. Накамура и Такасаки (1970) показали, что мезодерма возникает из краевых (экваториальных) клеток на границе между анимальным и вегетативным полюсами. Лаборатории Накамуры и Ньюкупа позже продемонстрировали, что свойства этой новообразованной мезодермы могут быть вызваны подлежащими вегетативными (презумптивными энтодермальными) клетками. Удаляя экваториальные клетки (т. е. презумптивную мезодерму) из бластулы, Ньюкуп (1969, 1973, 1977) обнаружил, что ни анимальная шапочка (презумптивная эктодерма), ни вегетативная чаша (презумптивная энтодерма) не могут дать мезодермальную ткань. Однако после совмещения анимальной шапочки с вегетативной чашей клетки анимальной шапочки оказались индуцированными к образованию мезодермальных структур, таких как хорда, мышцы, клетки почки и крови. Полярность

этой индукции (т. е. какую мезодерму сформируют клетки анимальной шапочки — дорсальную или вентральную) зависела от того, с дорсальной или вентральной стороны был взят энтодермальный (вегетативный) фрагмент. В то время как вентральные и латеральные вегетативные клетки (расположенные ближе к месту проникновения сперматозоида) индуцируют вентральную (мезенхима, кровь) и промежуточную (почки) мезодерму, дорсальные вегетативные клетки специфицируют компоненты дорсальной мезодермы (сомиты, хорду), включая те клетки, которые приобретут свойства организатора. Самые дорсальные вегетативные клетки бластулы, которые способны индуцировать организатор, были названы центром Ньюкупа (Gerhart et al., 1989).

ДОРСАЛЬНЫЙ СИГНАЛ, ЧАСТЬ 2: β -КАТЕНИН

После того как была открыта особая природа центра Ньюкупа, встал важный вопрос: чем обусловлены особые свойства дорсальных вегетативных клеток? Основным кандидатом на роль фактора, формирующего центр Ньюкупа в этих вегетативных клетках, был β -катенин. В гл. 10 мы наблюдали, что β -катенин отвечает за спецификацию микромеров зародыша морского ежа. Этот многофункциональный белок оказался ключевым фактором и в формировании дорсальных тканей амфибии. Экспериментальное удаление данной молекулы приводит к отсутствию

дорсальных структур, в то время как в результате инъекции экзогенного β -катенина в вентральную сторону эмбриона образуется вторичная ось (McMahon and Moon, 1989; Smith and Harland, 1991; Sokol et al., 1991; Heasman et al., 1994a; Funayama et al., 1995; Guger and Gumbiner, 1995).

У зародышей шпорцевой лягушки β -катенин первоначально синтезируется из материнской мРНК по всему эмбриону (Yost et al., 1996; Larabell et al., 1997). Он начинает накапливаться в дорсальной области яйцеклетки во время движений цитоплазмы при оплодотворении, накопление продолжается также преимущественно на дорсальной стороне в ходе раннего дробления. Накопление β -катенина можно наблюдать в ядрах дорсальных клеток, и, по-видимому, оно охватывает как клетки области центра Ньюкупа, так и область организатора (рис. 11.14; Schneider et al., 1996; Larabell et al., 1997).

Если β -катенин первоначально присутствует в эмбрионе, как он оказывается ровно на противоположной стороне точки проникновения сперматозоида? Ответ, по-видимому, заключается в локализации трех определенных белков в кортикальной цитоплазме яйцеклетки. Белки Wnt11, GSK3-связывающий белок (GBP) и Dishevelled (Dsh) вместе перемещаются от вегетативного полюса яйцеклетки к будущей дорсальной стороне эмбриона после оплодотворения. При изучении Wnt-пути мы узнали, что β -катенин разрушается киназой 3 гликогенсинтазы (GSK3; см. гл. 4). Действительно, при добавлении к яйцеклет-

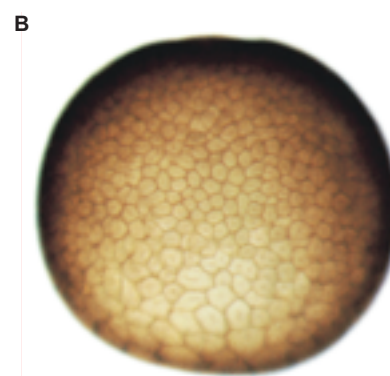
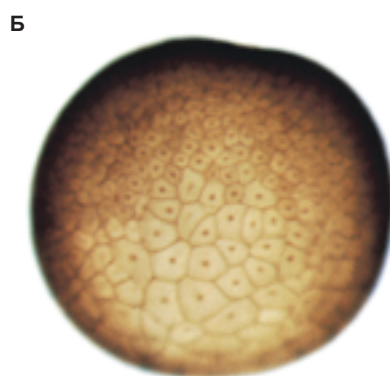
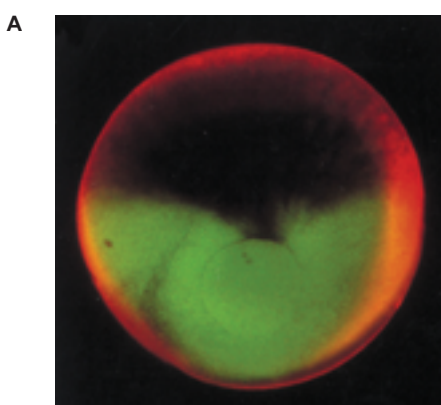


Рис. Б и В из: S. Schneider et al., 1996. *Mech Dev* 57: 191–198, с разрешения P. Hausen

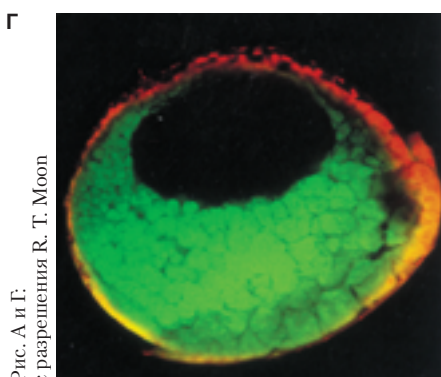


Рис. А и Г с разрешения R. T. Moon

Рис. 11.14. Роль β -катенина в спецификации дорсально-вентральной оси. Дифференциальная транслокация β -катенина в ядра бластомеров шпорцевой лягушки. **А.** На ранней двухклеточной стадии β -катенин (оранжевый) расположен преимущественно на дорсальной поверхности. **Б.** Презумптивная дорсальная сторона бластулы, окрашенная на β -катенин, с четкой локализацией ядер. **В.** Окраска ядер неразличима на вентральной стороне того же эмбриона. **Г.** Дорсальная локализация β -катенина сохраняется в ходе стадии гастрюлы

кам активированный белок GSK3 стимулирует деградацию β -катенина и блокирует формирование оси, и если эндогенный GSK3 нокаутирован его доминантно-негативной формой белка в вентральных клетках раннего зародыша, то образуется вторая ось (рис. 11.15А; He et al., 1995; Pierce and Kimelman, 1995; Yost et al., 1996).

GSK3 может быть деактивирован с помощью GBP и Dishevelled. Эти два белка высвобождают GSK3 из комплекса и не позволяют ему связываться и разрушать β -катенин. В ходе первого клеточного цикла микротрубочки образуют параллельные ряды в вегетативной части яйца, и GBP движется по микротрубочкам, связавшись с моторным белком-АТФазой, кинезином, который способен перемещаться по ним. Кинезин всегда мигрирует к растущему концу микротрубочек, и в момент оплодотворения это означает перемещение к точке, противоположной месту проникновения сперматозоида, т. е. к будущей дорсальной стороне (рис. 11.15Б–Г). Dishevelled, который изначально находится в кортексе вегетативного полюса, захватывает на GBP, и вместе они начинают перемещаться вдоль микротубулярного монорельса (Miller et al., 1999; Weaver et al., 2003). Оказавшись в точке, противоположной месту проникновения сперматозоида, GBP и Dsh освобождаются от микротрубочек. Здесь они инактивируют GSK3, позволяя β -катенину накапливаться и запускать регуляторную сеть генов для спецификации дорсальных клеток, тогда как β -катенин на противоположной стороне (будущие вентральные клетки) деградирует (рис. 11.15Д, Е; Weaver and Kimelman, 2004).

Но простого переноса этих белков на дорсальную сторону зародыша для защиты β -катенина, по-видимому, недостаточно. Вероятно, там происходит секрета паракринного фактора Wnt, активирующего путь защиты β -катенина; это достигается за счет действия Wnt11. Если синтез Wnt11 подавлен (путем введения антисмысловых олигонуклеотидов Wnt11 в ооциты), организатор не формируется. Кроме того, мРНК Wnt11 локализуется в вегетативном кортексе во время оогенеза и перемещается в будущую дорсальную часть эмбриона путем кортикальной ротации цитоплазмы яйцеклетки (Tao et al., 2005; Cuykendall and Houston, 2009). Здесь происходит трансляция белка, который концентрируется и секретируется на дорсальной стороне эмбриона (Ku and Melton, 1993; Schroeder et al., 1999; White and Heasman, 2008). Таким образом, во время первого деления дробления GBP, Dsh и Wnt11 попадают в будущую дорсальную часть эмбриона, где GBP и Dsh могут инициировать инактивацию GSK3 и последующую защиту β -катенина. Wnt11 усиливает сигнал β -катенина и стабилизирует GBP и Dsh, организуя их для защиты β -катенина; β -катенин может соединяться с другими факторами транскрипции, придавая им новые свойства.

? Загадки развития

Ясно, что у β -катенина много своих транскрипционных мишеней, но что было бы, если бы он мог влиять на всю «дорсализирующую» сеть генов? Если бы у него была великая сила, способная организовать хроматин? Если это заинтриговало вас, обратитесь к исследованию Blythe et al., 2010.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

МИШЕНИ β -КАТЕНИНА

Показано, что β -катенин в зародышах *Xenopus* комбинируется с фактором транскрипции Tcf3, в результате чего Tcf3 из репрессора становится активатором транскрипции. Экспрессия мутантной формы Tcf3, в которой отсутствует домен связывания с β -катенином, приводит к появлению зародышей, у которых не образуются дорсальные структуры (Molenaar et al., 1996). Комплекс β -катенина и Tcf3 связывается с промоторами нескольких генов, критически важных для формирования оси. Например, *twin* и *siamois* кодируют гомеодоменные транскрипционные факторы и экспрессируются в области организатора сразу после перехода к средней бластуле. Если эти гены эктопически экспрессируются в вентральных клетках, вторичная ось появляется на бывшей вентральной стороне эмбриона; и, если не происходит кортикальная полимеризация микротрубочек, *siamois* не экспрессируются (Lemaire et al., 1995; Brannon and Kimelman, 1996). Считается, что белок Tcf3 ингибирует транскрипцию *siamois* и *twin*, связываясь с промоторами этих генов в отсутствие β -катенина. Однако, если β -катенин связывается с Tcf3, репрессор становится активатором и происходит транскрипция *siamois* и *twin* (рис. 11.16).

Белки Siamois и Twin связываются с энхансерами нескольких генов, участвующих в работе организатора (Fan and Sokol, 1997; Bae et al., 2011). К ним относят гены, кодирующие факторы транскрипции Goosecoid и Xlim1 (имеют решающее значение при образовании дорсальной мезодермы) и антагонисты паракринных факторов хордин, Noggin, Frzb и Cerberus (направляют эктодерму на путь нейронной дифференцировки; Laurence et al., 1997; Engleka and Kessler, 2001). В клетках вегетативного полюса Siamois и Twin, по-видимому, объединяются с вегетативными транскрипционными факторами, помогая активировать энтодермальные гены (Lemaire et al., 1995). Можно предположить, что, если дорсальная сторона эмбриона содержит β -катенин, он позволяет экспрессировать Twin и Siamois в этой области, что, в свою очередь, может инициировать образование организатора.

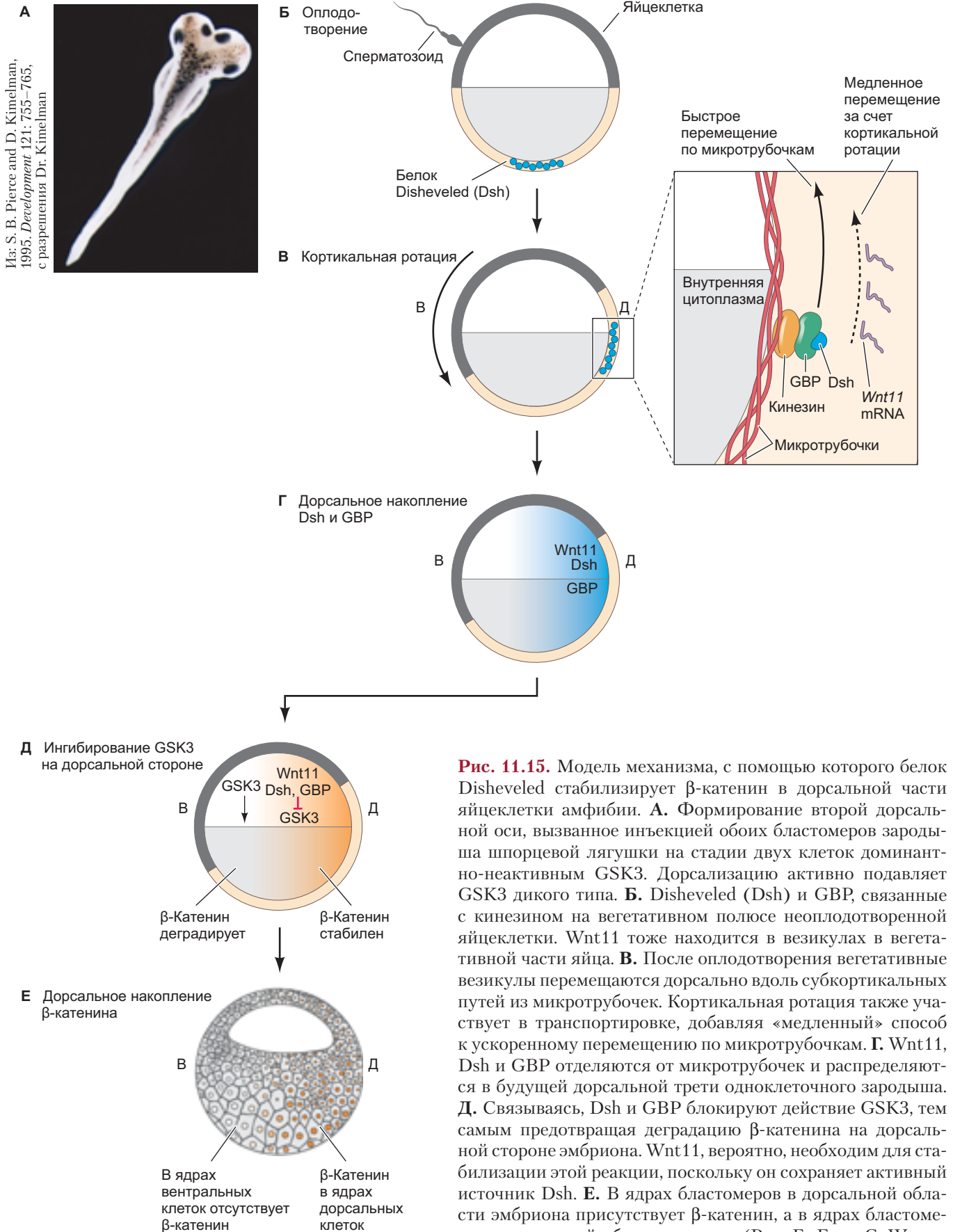
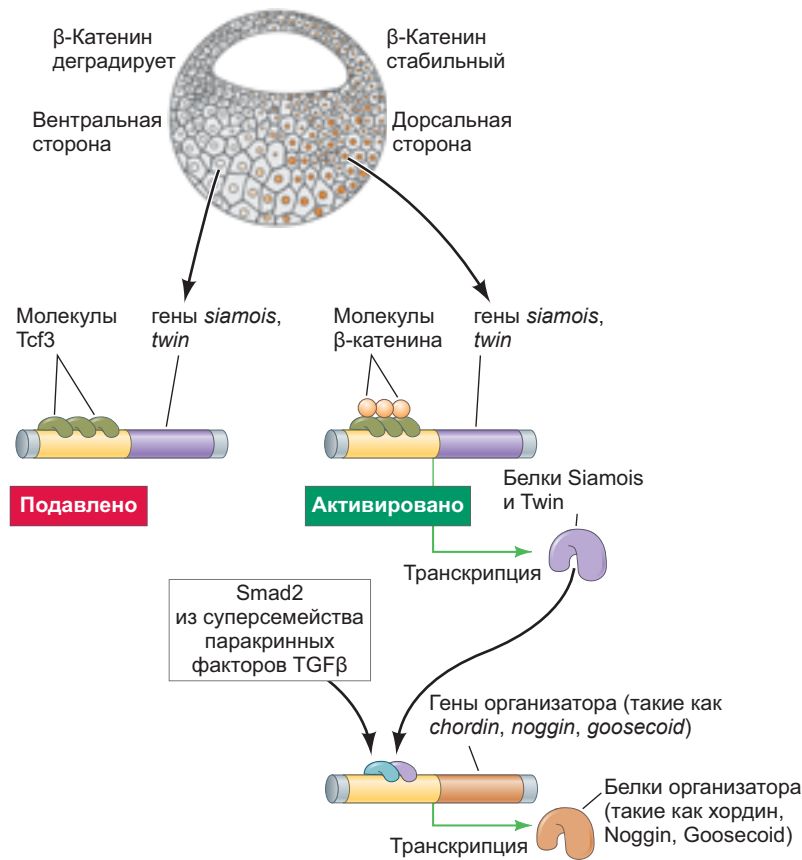


Рис. 11.15. Модель механизма, с помощью которого белок Disheveled стабилизирует β -катенин в дорсальной части яйцеклетки амфибии. **А.** Формирование второй дорсальной оси, вызванное инъекцией обоих бластомеров зародыша шпорцевой лягушки на стадии двух клеток доминантно-неактивным GSK3. Дорсализацию активно подавляет GSK3 дикого типа. **Б.** Disheveled (Dsh) и GBP, связанные с кинезином на вегетативном полюсе неоплодотворенной яйцеклетки. Wnt11 тоже находится в везикулах в вегетативной части яйца. **В.** После оплодотворения вегетативные везикулы перемещаются дорсально вдоль субкортикальных путей из микротрубочек. Кортикальная ротация также участвует в транспортировке, добавляя «медленный» способ к ускоренному перемещению по микротрубочкам. **Г.** Wnt11, Dsh и GBP отделяются от микротрубочек и распределяются в будущей дорсальной трети одноклеточного зародыша. **Д.** Связываясь, Dsh и GBP блокируют действие GSK3, тем самым предотвращая деградацию β -катенина на дорсальной стороне эмбриона. Wnt11, вероятно, необходим для стабилизации этой реакции, поскольку он сохраняет активный источник Dsh. **Е.** В ядрах бластомеров в дорсальной области эмбриона присутствует β -катенин, а в ядрах бластомеров вентральной области его нет. (Рис. Б–Е из: С. Weaver and D. Kimelman, 2004. *Development* 131: 3491–3499.)

Рис. 11.16. Совокупность событий, предположительно необходимых для осуществления организатором индукции в дорсальной мезодерме. Микротрубочки обеспечивают смещение белков Dishevelled и Wnt11 на дорсальную сторону эмбриона. Dsh (уже имеющийся в вегетативном кортексе и только что синтезированный за счет Wnt11) связывается с GSK3, тем самым позволяя β -катенину накапливаться в будущей дорсальной части эмбриона. Во время дробления β -катенин проникает в ядра и связывается с Tcf3 с образованием транскрипционного фактора, который активирует гены, кодирующие белки Siamois и Twin. Siamois и Twin в организаторе взаимодействуют с фактором транскрипции Smad2, активированным на вегетативной стороне членами суперсемейства TGF β (Nodal-родственными белками, Vg1, активин и т. д.). Вместе эти три фактора транскрипции активируют гены организатора, такие как *chordin*, *noggin* и *goosecoid*. Присутствие фактора транскрипции VegT в энтодерме предотвращает экспрессию генов организатора за пределами его области. (По данным: R. T. Moon and D. Kimelman, 1998. *BioEssays* 20: 536–545.)



ДОРСАЛЬНЫЙ СИГНАЛ, ЧАСТЬ 3: СИНЕРГИЯ С ВЕГЕТАТИВНЫМИ СИГНАЛАМИ

Фосфорилированный транскрипционный фактор Smad2 важен не только для формирования различных путей развития мезодермальных клеток вдоль дорсально-вентральной оси (как обсуждалось ранее), но и для активации генов, присущих самому организатору. Smad2 активируется в мезодермальных клетках тогда, когда он фосфорилируется в ответ на Nodal-подобные паракринные факторы, выделяемые вегетативными клетками под мезодермой (Branon and Kimelman, 1996; Engleka and Kessler, 2001). Важно, что Nodal-подобные белки образуют градиент по всей энтодерме, от низких концентраций на вентральной стороне к высоким на дорсальной (Opuma et al., 2002; Rex et al., 2002; Chea et al., 2005). Vg1 и Nodal-подобные белки действуют вместе, вызывая дополнительную активацию Smad2, а градуированное распределение Nodal-подобных белков может давать дифференциальные транскрипционные ответы (Agius et al., 2000). Тогда возникает вопрос: как устанавливается дорсально-вентральный градиент Nodal-подобных белков?

Градиент Nodal-подобных белков в значительной степени формируется благодаря β -катенину. Высокие уровни β -катенина активируют экспрессию генов Nodal-подобных белков (рис. 11.17). В дор-

сальных бластомерах (центр Ньюкупа) β -катенин взаимодействует с фактором транскрипции VegT, активируя гены *Xenopus nodal-related 1, 5 и 6* (*Xnr1, 5 и 6*) еще до перехода к средней бластуле. У вентральных бластомеров в энтодерме отсутствует экспрессия этих генов. В области, которая станет передней частью организатора, — энтодерме глотки — более высокие уровни Nodal-подобных белков приводят впоследствии к более высоким концентрациям активированного Smad2. Белок Smad2 может связываться с промотором гена *hhex*, а затем Twin и Siamois (индуцируемые β -катенином) совместно с Nhex активируют гены, индуцирующие клетки глоточной энтодермы к образованию энтодермы передней кишки и к индукции развития передней части мозга (Smithers and Jones, 2002; Rankin et al., 2011). Считается, что несколько меньшие уровни Smad2 активируют экспрессию гена *goosecoid* в клетках, которые образуют прехордальную мезодерму и хорду. Даже совсем небольшая концентрация Smad2 приводит к образованию латеральной и вентральной мезодермы.

Таким образом, формирование дорсальной мезодермы и организатора происходит через активацию критических факторов транскрипции путем пересечения и объединения сигнальных путей. Первый путь — это путь комплекса Wnt/ β -катенин, который активирует гены, кодирующие факторы транс-

крипции Siamois и Twin. Второй путь — это вегетативный путь активации экспрессии Nodal-подобных паракринных факторов, которые, в свою очередь, активируют транскрипционный фактор Smad2 в надлежащих мезодермальных клетках. Высокие уровни белков транскрипционных факторов Smad2 и Siamois/Twin работают в пределах клеток дорсальной мезодермы и активируют гены, которые придают этим клеткам свойства организатора (Germain et al., 2000; Cho, 2012; рис. 11.15–11.17).

Функции организатора

В то время как клетки центра Ньюкупа остаются энтодермальными, клетки организатора образуют дорсальную мезодерму и мигрируют внутрь, занимая свое положение под дорсальной эктодермой. Клетки организатора в итоге вносят вклад в образование четырех типов клеток: энтодермы глотки, головной мезодермы (прехордальная пластинка), дорсальной

мезодермы (прежде всего хорда) и дорсальной губы бластопора (Keller, 1976; Gont et al., 1993). Клетки будущей энтодермы глотки и прехордальной пластинки мигрируют из ткани организатора первыми и индуцируют передний и средний мозг. Дорсальная мезодерма индуцирует задний и средний мозг. Дорсальная губа бластопора, оставшаяся при завершении гастрюляции, в итоге становится хордонеуральной петлей, которая индуцирует образование кончика хвоста. Среди функций ткани-организатора можно выделить четыре наиболее важных:

1. Способность к самодифференцировке дорсальной мезодермы (прехордальной пластинки, хордомезодермы и т. д.).
2. Способность дорсализировать окружающую мезодерму в параксиальную (формирующую сомиты) мезодерму, без этой индукции она развивается в вентральную.
3. Способность дорсализировать эктодерму и индуцировать формирование нервной трубки.
4. Способность инициировать движения гастрюляции.

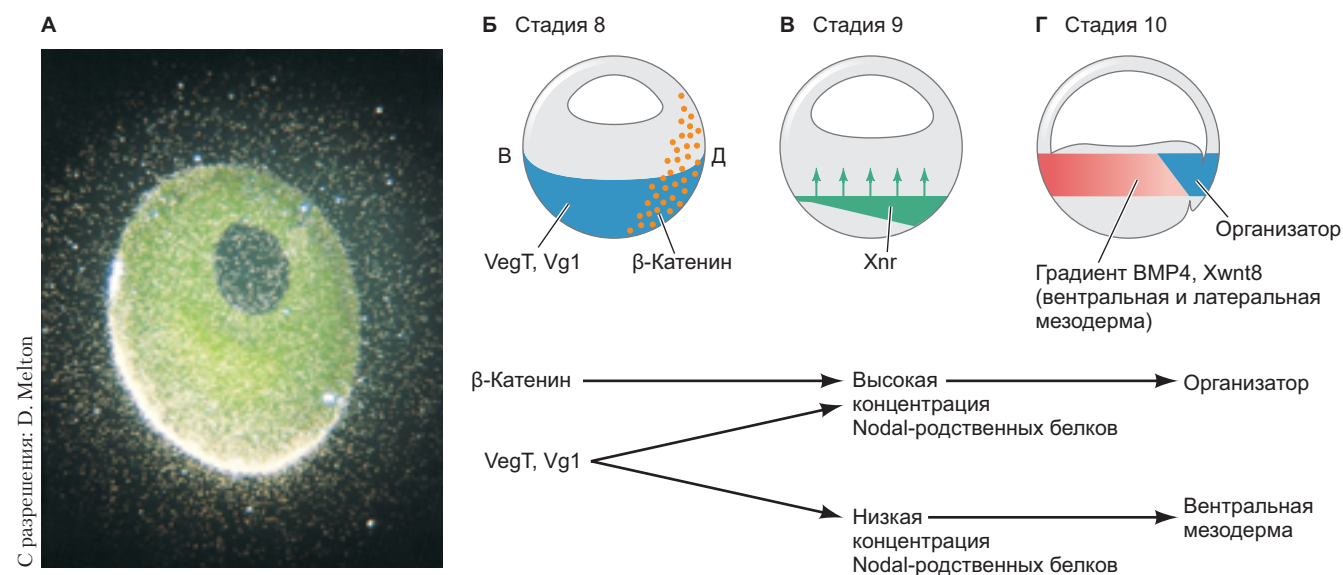


Рис. 11.17. Вегетативная индукция мезодермы. **А.** Материнская РНК, кодирующая Veg1 (яркий белый полумесяц), связана с вегетативным кортексом ооцита шпорцевой лягушки. Трансляция генетической информации (вместе с материнским VegT) начнется после оплодотворения. Оба белка, по-видимому, имеют решающее значение для способности клеток вегетативного полюса индуцировать клетки над ними к образованию мезодермы. **Б–Г.** Модель индукции мезодермы и формирования организатора путем взаимодействия β-катенина и белков TGFβ. **Б.** На стадии поздней бластулы Veg1 и VegT можно обнаружить в вегетативном полушарии; β-катенин в свою очередь находится в дорсальной области. **В.** β-Катенин, действуя синергично с Veg1 и VegT, активирует гены *Xenopus nodal-related* (*Xnr*). При этом в энтодерме создается градиент белков Xnr, где самый высокий уровень отмечается в дорсальной области. **Г.** Спецификация мезодермы происходит под действием градиента Xnr. На участках мезодермы с небольшой концентрацией Xnr или полным его отсутствием наблюдаются высокие уровни BMP4 и Xwnt8; впоследствии из этих участков образуется вентральная мезодерма. Участки с промежуточной концентрацией Xnr становятся латеральной мезодермой. При высокой концентрации Xnr активируется *goosecoid* и другие дорсальные мезодермальные гены и мезодермальная ткань становится организатором. (Рис. Б–Г из: E. Aigius et al., 2000. *Development* 127: 1173–1183.)

Индукция нейроэктодермы и дорсальной мезодермы: ингибиторы BMP

Данные экспериментальной эмбриологии показали, что одним из наиболее важных свойств организатора была секреция растворимых факторов. Доказательства наличия таких диффузных сигналов организатора поступили из нескольких источников. Во-первых, Ганс Гольфретер (1933) показал, что, если хорда не может мигрировать под эктодерму, эктодерма не образует нервную ткань (и станет эпидермисом). Наиболее полное подтверждение важности этих растворимых факторов было получено позднее в исследованиях с использованием мембранных фильтров, проведенных финскими учеными (Saxén, 1961; Toivonen et al., 1975; Toivonen and Wartiovaara, 1976). В эксперименте ткань дорсальной губы тритона была размещена на одной стороне фильтра с порами такого размера, что клеточные отростки не могли через них проникнуть, а на другой стороне помещали компетентную эктодерму гастрюлы. Через несколько часов в эктодермальной ткани наблюдали появление нейронных структур. Однако выявление факторов, образуемых организатором, заняло еще четверть века.

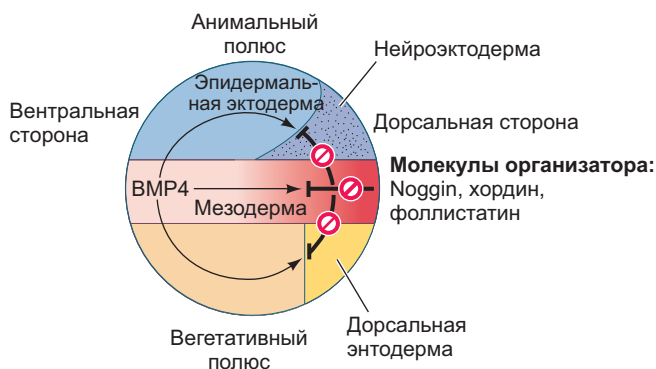
Оказалось, что механизм, с помощью которого организатор «индуцирует» развитие нервной системы, не был интуитивно понятным. Ученые искали ту молекулу, секретируемую организатором и захватываемую эктодермой, которая впоследствии индуцирует эктодерму к образованию нервной ткани. Однако молекулярные исследования привели к замечательному и не столь очевидному выводу: формируется эпидермис (и вентральная мезодерма), а не нервная ткань. Индукция эктодермы к образованию эпидермиса происходит путем связывания **морфогенетических белков кости** (bone morphogenetic proteins, BMP), в таком случае нервная система образуется из той области эктодермы, которая *защищена* от индукции BMP-ингибирующими молекулами (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1994, 1997). Другими словами: 1) «судьба по умолчанию» для эктодермы — стать нейральной тканью; 2) определенные части зародыша секретируют BMP и тем самым индуцируют эктодерму превращаться в эпидермис; 3) ткань организатора

действует путем секреции молекул, блокирующих BMP, тем самым позволяя эктодерме, «защищенной» этими ингибиторами BMP, стать нервной тканью.

Таким образом, белки BMP побуждают наивные эктодермальные клетки образовывать эпидермис, в то время как организатор производит вещества, которые блокируют эту индукцию (Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1995; Piccolo et al., 1996; Zimmerman et al., 1996; Iemura et al., 1998). У шпорцевой лягушки основными индукторами эпидермиса являются BMP4 и его близкие родственники BMP2, BMP7 и ADMP. Первоначально один из этих белков BMP4 экспрессируется во всех эктодермальных и мезодермальных областях поздней бластулы. Однако во время гастрюляции факторы транскрипции (такие как Goosecoid), будучи индуцированными белками Siamois и Twin, предотвращают транскрипцию гена *bmp4* в дорсальной области эмбриона, ограничивая его экспрессию в вентролатеральной краевой зоне (Blitz and Cho, 1995; Hemmati-Brivanlou and Thomsen, 1995; Northrop et al., 1995; Steinbeisser et al., 1995; Yao and Kessler, 2001). В эктодерме факторы BMP подавляют экспрессию генов (таких как *sox3* (Rogers et al., 2008, 2009a, b), *foxD4* и *neurogenin*), участвующих в образовании нервной ткани, и в то же время активируют другие гены, задействованные в спецификации эпидермиса (Lee et al., 1995). В мезодерме, по-видимому, концентрационный градиент BMP4 активирует различные наборы мезодермальных генов: при отсутствии BMP4 образуется дорсальная мезодерма; при его небольшой концентрации — промежуточная мезодерма; при высокой концентрации будет формироваться вентральная (рис. 11.18; Gawantka et al., 1995; Hemmati-Brivanlou and Thomsen, 1995; Dosch et al., 1997).

Действие организатора обусловлено блокированием BMP. Три основных ингибитора BMP, которые выделяет организатор, — Noggin, хордин и фоллистатин. Гены, кодирующие эти белки, являются одними из наиболее важных генов, которые активируются действием Smad2 и Siamois/Twin (Carnac et al., 1996; Fan and Sokol, 1997; Kessler, 1997). Четвертый ингибитор BMP Norrin, по-видимому, аккумулируется в анимальном полушарии ооцита, где он блокирует BMP в дорсальной эктодерме (Xu et al., 2012).

Рис. 11.18. Модель действия организатора. BMP4 (наряду с некоторыми другими молекулами) является мощным вентрализующим фактором. Белки-организаторы, такие как Noggin, хордин и фоллистатин, блокируют действие BMP4; их ингибирующее действие можно увидеть во всех трех зародышевых листках. (По данным: E. De Robertis and Y. Sasai, 1996. *Nature* 380: 37–40 и Y. Sasai et al., 1996. *EMBO J* 15: 4547–4555.)



РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Организатор, полный антагонистов

В 1992 г. Смит и Харланд создали библиотеку кДНК из дорсализованных (обработанных хлоридом лития) гаструл лягушки *Xenopus*. мРНК, синтезированные из наборов ДНК, инъекцировали вентрализованным эмбрионам (без нервной трубки), которые были получены ультрафиолетовым облучением из зародышей на ранних стадиях. Наборы плазмид, мРНК которых сохраняли дорсальные структуры в этих эмбрионах, делили на более мелкие и т. д., пока не были выделены клоны с единственной мРНК, способной восстанавливать дорсальную ткань в таких эмбрионах.

NOGGIN

Один из этих клонов содержал ген белка *Noggin* (рис. 11.19А). Инъекция мРНК *noggin* в УФ-облученные одноклеточные эмбрионы полностью сохраняла развитие дорсальных структур, при этом сохранялась способность сформировать зародыш целиком (Lamb et al., 1993; Smith et al., 1993). *Noggin* — это секретируемый организатором белок, способный выполнять две его основные функции: индуцировать дорсальную эктодерму к образованию нервной ткани и дорсализировать клетки мезодермы, которые в противном случае могли бы участвовать в формировании вентральной мезодермы (Smith et al., 1993). Смит и Харланд показали, что после транскрипции мРНК *noggin* сначала локализуется в области дорсальной губы бластопора, а затем экспрессируется в хорде (рис. 11.19Б). *Noggin* связывается с BMP4 и BMP2, ингибируя их связывание с рецепторами (Zimmerman et al., 1996).

ХОРДИН

Белок хордин (*chordin*) был выделен из клонов кДНК, мРНК которых присутствовала только в дорсализованных, но не вентрализованных зародышах (Sasai et al., 1994). Для тестирования этих клонов их инъекцировали в вентральные бластомеры, чтобы проследить, будут ли они индуцировать образование вторичной оси. Один из клонов, способных индуцировать вторичную нервную трубку, содержал ген *chordin*; было обнаружено, что мРНК этого гена локализуется сначала в дорсальной губе бластопора и позже в хорде (рис. 11.20). Направленные против хордина антисмысловые морфолиновые олигонуклеотиды полностью блокировали способность трансплантата-организатора вызывать образование вторичной центральной нервной системы (Oelgeschläger et al., 2003). Из всех

известных генов организатора *chordin* легче других активируется β -катенином (Wessely et al., 2004). Как и *Noggin*, хордин связывается непосредственно с BMP4 и BMP2 и препятствует образованию их комплексов с рецепторами (Piccolo et al., 1996).

ФОЛЛИСТАТИН

мРНК третьего белка фоллистатина, секретируемого организатором, также транскрибируется в дорсальной губе бластопора и хорде. Фоллистатин был неожиданно обнаружен в организаторе в результате эксперимента, не направленного напрямую на его поиск. Али Хеммати-Бриванлоу и Дуглас Мелтон (1992, 1994) хотели выяснить, необходим ли белок активин для индукции мезодермы. В поисках индуктора мезодермы они обнаружили, что фоллистатин, являющийся ингибитором как активина, так и BMP, заставляет эктодерму образовывать нервную ткань. Затем они предположили, что в нормальных условиях эктодерма становится нейральной, если BMP не индуцирует образование эпидермиса. Эта модель была подтверждена и объяснена благодаря экспериментам с диссоциацией клеток, которые также дали неоднозначные результаты. Три исследования в 1989 г. проведенные Грюнзом и Таке, Сато и Сарджентом, Годсэйвом и Слэком, показали, что, если диссоциировать на клетки целые зародыши или только анимальные шапочки, впоследствии сформируется нервная ткань. Эти результаты можно было бы объяснить тем, что «состояние по умолчанию» эктодермы не эпидермальное, а нейральное, и для приобретения тканью эпидермального фенотипа необходима индукция. Таким образом, организатор блокирует индукцию эпидермиса путем инактивации BMP.

ЭКТОДЕРМАЛЬНОЕ СМЕЩЕНИЕ

Эктодерма над хордой также, по-видимому, оказывается принужденной превращаться в нейроэктодерму благодаря β -катенину, который распространяется по всей периферии яйцеклетки. Это вызывает экспрессию белков *Siamois* и *Twint* в клетках, которые станут нейроэктодермальными. Здесь эти транскрипционные факторы выполняют две критически важные функции. Во-первых, они активируют гены (такие как *foxD4* и *sox11*), которые позволят данным клеткам стать клетками нейроэктодермы (рис. 11.21). Эти гены, однако, могут подавляться действием белков BMP. Так, в качестве второго шага в ходе гастрюляции мезодерма организатора продуцирует белки, не дающие сигналам BMP достигнуть клеток эктодермы (Klein and Moody, 2015).

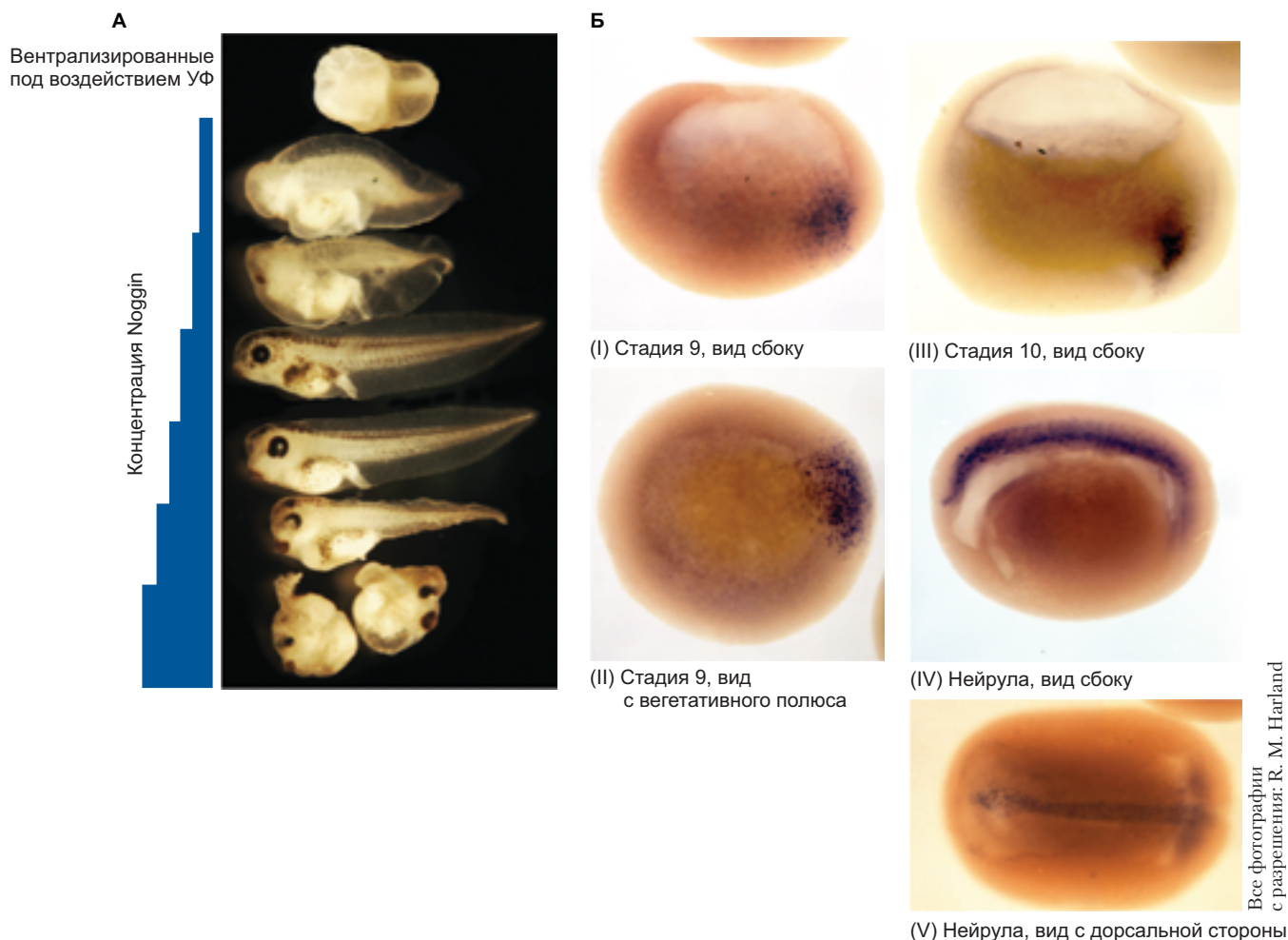
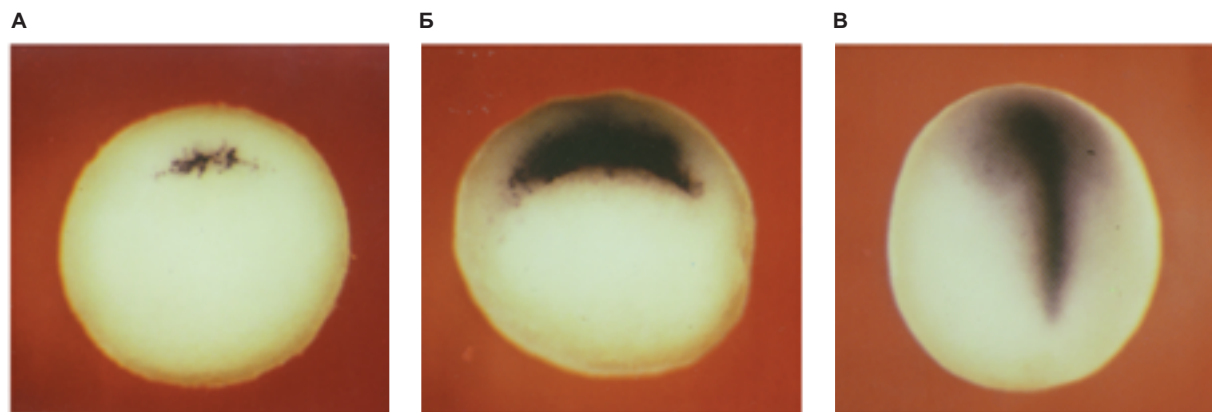


Рис. 11.19. Растворимый белок *Noggin* дорсализирует эмбрион амфибии. **А.** Сохранение дорсальных структур под действием белка *Noggin*. Когда яйцеклетки шпорцевой лягушки подвергаются воздействию ультрафиолетового (УФ) излучения, кортикальная ротация не происходит, вследствие чего у зародышей не формируются дорсальные структуры (*вверху*). Если такому эмбриону вводить мРНК *noggin*, в зависимости от дозировки у него развиваются дорсальные структуры (*сверху вниз*). Если мРНК *noggin* введено слишком много, эмбрион производит дорсальные и anteriорные ткани вместо вентральных и постериорных структур, образуя больше, чем одну голову (*снизу*). **Б.** Локализация мРНК *noggin* в ткани организатора, визуализированная методом гибридизации *in situ*. При гастрুলляции (I и II, стадия 9) мРНК *noggin* (темные области) накапливается в дорсальной краевой зоне. Когда клетки вворачиваются (I и III, стадии 9 и 10), мРНК *noggin* можно наблюдать в дорсальной губе бластопора. Во время конвергентного расширения (III, стадия 10) *noggin* экспрессируется в предшественниках хорды, прехордальной пластинки и глоточной энтодермы, которые в нейруле (IV, V) простираются под эктодермой в центре зародыша

Сохранение передачи сигналов BMP в ходе дорсально-вентральной разметки

Примечательно, что способность BMP индуцировать покровную эктодерму и способность антагонистов BMP специфицировать нейроэктодерму можно наблюдать у многих групп животных. У *Drosophila* гомолог BMP Decapentaplegic (Dpp) специфицирует гиподерму (покровный слой тела), в то время как антагонист BMP белок Short gastrulation (Sog)

блокирует действие Dpp и специфицирует нервную систему. Белок Sog является гомологом хордина. Эти гомологичные белки насекомых не только похожи на своих «коллег», присутствующих у позвоночных, но и взаимозаменяемы. При введении мРНК *sog* в вентральные области эмбрионов *Xenopus* происходит индукция образования нормальной хорды и нервной трубки. Введение мРНК *chordin* в эмбрионы *Drosophila* приводит к образованию вентральной нервной ткани. Несмотря на то что



По данным: Y. Sasai et al., 1994. *Cell* 79: 779–790, с разрешения E. De Robertis.
Из: Y. Sasai et al., 1994. *Cell* 79: 779–790, с разрешения E. De Robertis

Рис. 11.20. Локализация мРНК *chordin*. **А.** Метод гибридизации *in situ* на тотальных препаратах показывает, что непосредственно перед гастрულიей мРНК *chordin* (темная область) экспрессируется в области, которая станет дорсальной губой бластопора. **Б.** Когда начинается гастрულიя, *chordin* экспрессируется на дорсальной губе бластопора. **В.** На более поздних стадиях гастрულიи мРНК *chordin* обнаруживается в тканях организатора

хордин дорсализирует эмбрион шпорцевой лягушки, на зародыш *Drosophila* он оказывает вентрализирующее действие. У *Drosophila* Dpp продуцируется на дорсальной стороне; у *Xenopus* BMP4 образуется вентрально. В обоих случаях Sog/Хордин способствует спецификации нервной ткани, блокируя эффекты Dpp/BMP4 (Hawley et al., 1995; Holley et al., 1995; De Robertis et al., 2000; Bier and De Robertis 2015). «Таким образом, членистоногие, похоже, являются перевернутыми позвоночными», — подчеркивал при попытке убедить других анатомов в единстве животного царства в 1840 г. наблюдательный французский анатом Жоффруа Сент-Илер

(Appel, 1987; Genikhovich et al., 2015; De Robertis and Moriyama, 2016).

Загадки развития

Если хордин и белки BMP оказываются гомологичными у мух и позвоночных, то гомологичны ли пути процессинга хордин и BMP? Каким образом линия, образованная белками Хордин и BMP, может регулировать оси зародыша так, что вне зависимости от размера зародыша разметка всегда происходит одинаково?

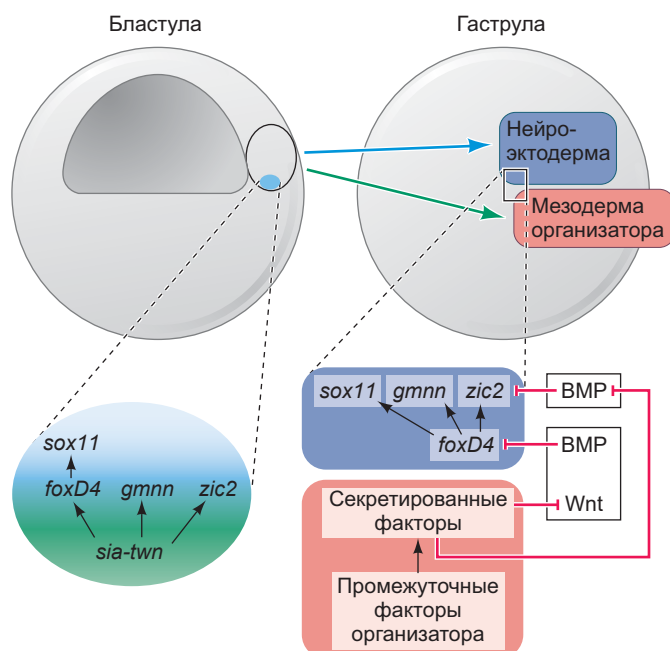


Рис. 11.21. Схема индукции активации генов нейроэпителии белками Siamois (Sia) и Twin (Twn). На стадии бластулы клетки, как ожидается, будут вызывать как мезодерму организатора, так и нейроэктодерму, экспрессирующие как *sia*, так и *twn*. Продукты этих генов активируют гены нейроэктодермы *foxD4*, *gmnn* и *zic2*. Последние кодируют факторы транскрипции, которые активируют другие нейронные гены, например *sox11*. На стадии гастреры потомки этих клеток образуют организатор мезодермы и нейроэктодермы. Здесь нейроэпителиальные гены активируются факторами, которые выделяются организатором и ингибируют пути BMP и Wnt. Если пути BMP и Wnt не заблокированы, транскрипция *sox11*, *gmnn*, *foxD4* и *zic2* подавляется. (По данным: S. L. Klein and S. A. Moody, 2015. *Genesis* 53: 308–320.)

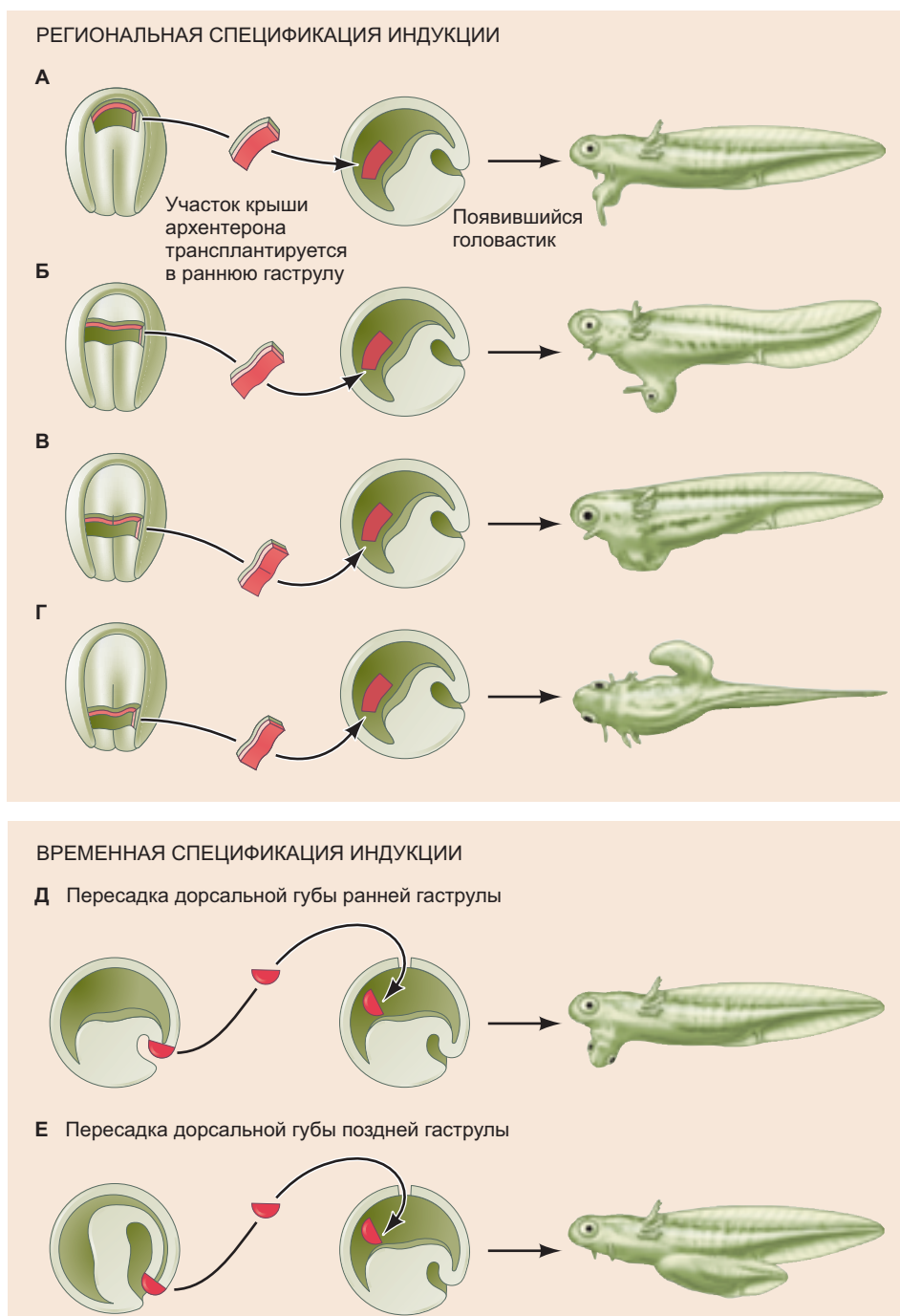
Региональная специфичность нейронной индукции вдоль антерио-постериорной оси

Так же как формирование дорсально-вентральной оси у животных основано на сигналинге BMP и его ингибиторов (область формирования нервной ткани является областью самых низких концентраций BMP), спецификация передне-задней оси основана на градиенте белков Wnt, например для головного конца характерны низкие их концентрации (Petersen and Reddien, 2009). Есть несколько исключений,

в которых градиент Wnt не обеспечивает основные сигналы при разметке (например, у *Drosophila*), но даже в этих случаях обнаружено присутствие остаточных паттернов Wnt (Vorwald-Denholtz and De Robertis, 2011).

У позвоночных одним из наиболее важных процессов, протекающих вдоль антерио-постериорной оси, является региональная спецификация производимых неральных структур. Организация переднего мозга, заднего мозга и туловищных областей нервной трубки происходит последовательно от передней к задней части соответственно. Ткань организатора не только индуцирует нервную трубку, но и уча-

Рис. 11.22. Региональная и временная спецификация индукции. Региональная спецификация индукции может быть продемонстрирована путем имплантации различных областей (отмечены красным) крыши архентерона (где расположена ткань организатора) в ранние гастролы *Triturus*. У появившихся зародышей развиваются вторичные дорсальные структуры. **А.** Голова с балансирами. **Б.** Голова с балансирами, глазами и передним мозгом. **В.** Задняя часть головы, промежуточного мозга и слуховых пузырей. **Г.** Хвостовой сегмент туловища. **Д, Е.** Временная спецификация способности к индукции. **Д.** Участки дорсальной губы ранних эмбрионов вызывают образование передних дорсальных структур при пересадке в ранние гастролы тритона. **Е.** Участки дорсальной губы более поздних зародышей, пересаженные в ранние гастролы тритона, создают более задние дорсальные структуры. (Рис. А–Г из: O. Mangold, 1933. *Naturwissenschaften* 21: 761–766; рис. Д, Е из: L. Saxén and S. Toivonen, 1962. *Primary Embryonic Induction*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.)



ствуется в спецификации ее областей. Эту зависимость от зоны индукции продемонстрировал супруг Хильды Мангольд Отто Мангольд в 1933 г. Он удалил четыре последовательных области крыши архентерона у зародышей тритона на стадии поздней гаструлы (крыша архентерона у этих эмбрионов — это та зона, где находится ткань организатора) и пересаживал эти фрагменты в бластоцель эмбрионов на стадии ранней гаструлы. Передняя часть крыши архентерона (содержащая головную мезодерму) индуцирует балансиры и части ротового аппарата; следующий отдел вызывает образование различных головных структур, включая обонятельный орган, глаза, балансиры и слуховые пузыри; третий отдел (включая хорду) индуцирует заднемозговые структуры; в конце концов задний отдел вызывает образование дорсальной части туловища и хвостовой мезодермы (рис. 11.22А–Г).

В дальнейших экспериментах Мангольд продемонстрировал, что, если дорсальную губу бластопора, полученную из ранней гаструлы саламандры, трансплантировать в другую раннюю гаструлу, трансплантат вызовет образование вторичной головы. Однако, когда участки дорсальной губы из поздней гаструлы трансплантировали в зародыши саламандры на ранней стадии, трансплантат вызвал образование вторичного хвоста (см. рис. 11.22Д, Е; Mangold, 1933). Эти результаты показывают, что первые клетки организатора, попавшие в эмбрион, индуцируют об-

разование головного мозга и головы, тогда как клетки, формирующие дорсальную губу в зародышах поздней стадии, индуцируют надлежащие клетки, вследствие чего они образуют спинной мозг и хвост.

Возник вопрос: «Какие молекулы регионально секретируются организатором, если первые клетки, вворачивающиеся через губу бластопора (клетки энтомеродермы), индуцируют образование головных структур, тогда как следующая часть вворачивающейся мезодермы (клетки хорды) производит туловищные и хвостовые структуры?» На рис. 11.23 показана возможная модель для этих индукций, элементы которой мы опишем в следующих «Дополнительных материалах».

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Головной индуктор: как между белками Wnt и BMP разворачиваются эпические битвы голов и хвостов

Передние области головы и головного мозга укреплены не хордой, а энтодермой глотки и головной (прехордальной) мезодермой (см. рис. 11.6В, Г и 11.23А). Эта энтомеродермальная ткань представляет собой передний край дорсальной губы бластопора. Примечательно, но кроме того, что данные клетки индуцируют передние головные

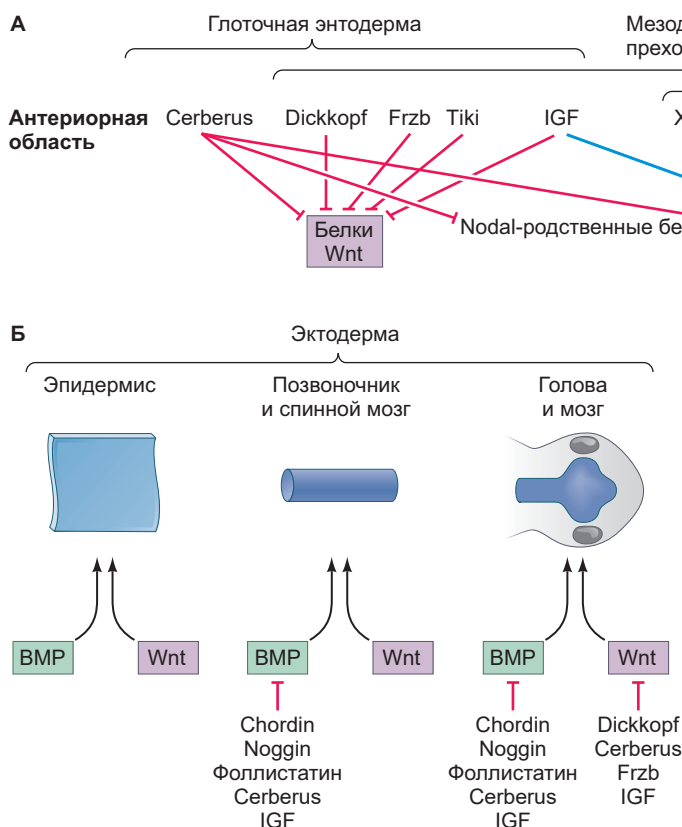


Рис. 11.23. Антагонисты паракринных факторов, секретируемые организатором, способны блокировать специфичные паракринные факторы, чтобы голова могла отличаться от хвоста. **А.** Энтодерма глотки, лежащая в основании головы, помимо всего прочего секретирует Dickkopf, Frzb и Cerberus. Dickkopf и Frzb блокируют белки Wnt; Cerberus блокирует белки Wnt, BMP и Nodal-родственные белки. Прехордальная пластинка секретирует блокаторы Wnt (Dickkopf и Frzb), и блокаторы BMP (хордин и Noggin). Хорда продуцирует блокаторы BMP — Noggin, хордин и фоллистатин, но не секретирует блокаторы Wnt. Инсулиноподобный фактор роста (IGF), секретируемый головной энтомеродермой, вероятно, действует на стыке хорды и прехордальной мезодермы. **Б.** Схема, отражающая функции паракринных антагонистов в эктодерме. Формирование мозга требует ингибирования путей как Wnt, так и BMP. Нейроны спинного мозга образуются, когда Wnt функционирует в отсутствие BMP. Эпидермис образуется в случае, когда активны оба пути

структуры, они делают это путем блокирования пути как Wnt, так и BMP-белков. Антагонисты Wnt, по-видимому, индуцируются высокими уровнями фосфорилированного Smad2 в ответ на секретируемые клетками вегетативного полушария Nodal и Vg1 (Agius et al., 2000; Birsoy et al., 2006).

CERBERUS: УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ПАРАКРИННЫЙ ИНГИБИТОР ДЛЯ ОБРАЗОВАНИЯ ГОЛОВЫ

Блокирование BMP-сигналов, исходящих от хорды, может вызвать индукцию образования туловищных структур, в то время как сигналы Wnt будут продолжать поступать. Чтобы образовалась голова, должны быть заблокированы сигналы как BMP, так и Wnt. Эту двойную функциональную блокаду обуславливает энтомезодерма передней части организатора (Glinka et al., 1997). В 1996 г. Боумистер вместе с коллегами-исследователями показали, что индукцию передних головных структур может осуществлять секретируемый белок, названный Cerberus (в честь трехглавой собаки, которая охраняла вход в Аид в греческой мифологии). Если мРНК *cerberus* ввести в бластомер шпорцевой лягушки на вегетативной вентральной области на 32-клеточной стадии, впоследствии у зародыша формируются эктопические головные структуры, предшественником которых являлась сама инъекцированная клетка и ее окружение.

Ген *cerberus* экспрессируется в клетках энтомезодермы глотки, происходящих от глубинных клеток области ранней дорсальной губы. Белок Cerberus может связывать молекулы BMP, Nodal-родственные белки и Xwnt8 (см. рис. 11.23A и 11.25; Piccolo et al., 1999). Если синтез Cerberus заблокирован, уровни BMP, Nodal-родственных белков и Wnt повышаются в anteriорной части эмбриона, вследствие чего сильно снижается способность передней энтомезодермы индуцировать образование головы (Silva et al., 2003).

ИНСУЛИНОПОДОБНЫЕ ФАКТОРЫ РОСТА И ФАКТОРЫ РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ

Все ингибиторы Wnt, о которых говорилось ранее, имели внеклеточное происхождение. Помимо них, область головы содержит еще один набор белков, препятствующих проникновению сигналов BMP и Wnt в ядро. **Факторы роста фибробластов** (fibroblast growth factor, FGF) и **инсулиноподобные факторы роста** (insulin-like growth factor, IGF) также необходимы для индукции образования мозга и плакод (Pera et al., 2001, 2014). Влияние IGF и FGF наиболее ярко выражено в передней части эмбриона, при этом и те и другие факторы инициируют каскад трансдукции сигналов рецепторной тирозинкиназы

(receptor tyrosine kinase, RTK) (см. гл. 4). Тирозинкиназы влияют на каскады трансдукции сигналов как BMP, так и Wnt (Richard-Parpaillon et al., 2002; Pera et al., 2014). При инъекции в вентральные мезодермальные бластомеры мРНК факторов IGF происходит образование эктопической головы, в то время как блокирование рецепторов IGF на anteriорном конце приводит к тому, что голова не формируется вовсе. И наконец, как вы позднее узнаете из глав 17, 18 и 19, FGF играют непосредственную роль в индукции и поддержании экспрессии генов, важных для мезодермальных клеточных линий и формирования конечностей, где их работа зачастую происходит аналогично в сочетании с сигналами Wnt и BMP.

РАЗМЕТКА ТУЛОВИЩА: СИГНАЛЫ WNT И РЕТИНОВАЯ КИСЛОТА

Тойвонен и Саксен в своем исследовании представили доказательства существования градиента постериоризирующего фактора, который будет специфицировать ткани туловища и хвоста эмбриона амфибии (Toivonen and Saxén, 1955, 1968; Saxén 2001). Активность этого фактора была наиболее высока на постериорном конце эмбриона, а в anteriорном направлении снижалась. Недавние исследования расширили эту модель: было предположено, что белки Wnt, в частности Wnt8, проявляют постериоризирующую активность (Domingos et al., 2001; Kiecker and Niehrs, 2001). У гастролы *Xenopus* можно наблюдать эндогенный градиент передачи сигналов Wnt и β -катенина: наиболее высокие значения присутствуют на заднем конце, а к переднему краю сигнал исчезает (рис. 11.24A). Кроме того, в результате воздействия Xwnt8 на развивающиеся эмбрионы в передней части зародыша образуются нейроны, схожие со спинномозговыми, а anteriорные маркеры переднего мозга не экспрессируются. И наоборот, подавление передачи сигналов Wnt (путем воздействия Frzb или Dickkopf на развивающийся зародыш) приводит к экспрессии anteriорных маркеров в нервных клетках в областях, располагающихся более постериорно. Несмотря на то что белки Wnt играют огромную роль в спецификации передне-задней оси, существуют и другие молекулы, вовлеченные в этот процесс. Фактически, градиенты Wnt, FGF и ретиновой кислоты (РК) в постериорноантериорном направлении определяют границы Нох-генов вдоль передне-задней оси (Wacker et al., 2004; Durston et al., 2010a, b). Мы обсудим эти механизмы в гл. 17.

Таким образом, в гастролу амфибии, по-видимому, существует два основных градиента — градиент BMP, который определяет дорсально-

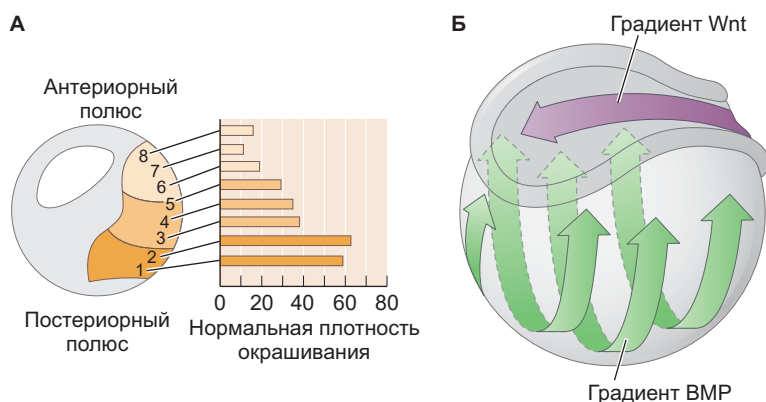


Рис. 11.24. Сигнальные градиенты и спецификация оси. **А.** Сигнальный путь Wnt постериоризует нервную трубку. Эмбрионы на стадии гастрюляции окрашивали на β -катенин и сравнивали плотность окрашивания между областями эктодермальных клеток, выявляя градиент β -катенина в презумптивной нервной пластинке. **Б.** Градиент Wnt определяет антерио-постериорную полярность, а градиент BMP — дорсально-вентральную. Было показано, что двойное взаимодействие градиентов, впервые обнаруженное у земноводных, характерно и для развития животных в целом. (Рис. А из: C. Kiecker and C. Niehrs, 2001. *Development* 128: 4189–4201; рис. Б из: C. Niehrs, 2004. *Nat Rev Genet* 5: 425–434.)

вентральную ось, и градиент Wnt, определяющий передне-заднюю ось тела (рис. 11.24Б). Следует помнить, что обе эти оси устанавливаются благодаря изначальным осям, которые определяются Nodal-родственными белками, паракринными факторами TGF β и β -катенином в вегетативных клетках. Базовая модель нейронной индукции представлена в виде схемы на **рис. 11.25**.

Загадки развития

Как происходит детерминация ресничек организатора лево-правой оси? Недавно проведенное исследование показывает, что сам по себе механизм рассеивания морфогена создается с помощью дифференциальной механической силы вдоль антерио-постериорной оси зародыша на стадии гастрюляции. Новые данные на этот счет могут заставить вас так «пораскинуть мозгами», что «зашевелятся» извилины. Прочтите Chien et al., 2018.

Спецификация лево-правой оси

Несмотря на то что развивающийся головастик внешне выглядит симметрично, некоторые внутренние органы, такие как сердце и кишечная трубка, располагаются неодинаково относительно правой и левой сторон. Другими словами, в дополнение к дорсально-вентральной и антерио-постериорной осям, зародыш имеет лево-правую ось. У всех изученных к настоящему времени позвоночных животных решающим событием в формировании лево-правой оси является экспрессия гена Nodal в мезодерме латеральной пластинки на левой стороне эмбриона. У лягушки *Xenopus* это ген *Xnr1* (*Xenopus nodal-related 1*). Если локализацию экспрессии *Xnr1* изменить на противоположную (так, чтобы она происходила исключительно справа), то аналогично меняется положение сердца (обычно находящееся слева), равно как и направление поворота кишки. Если *Xnr1* экспрессируется с обеих сторон, поворот кишки и расположение сердца определяются случайным образом.

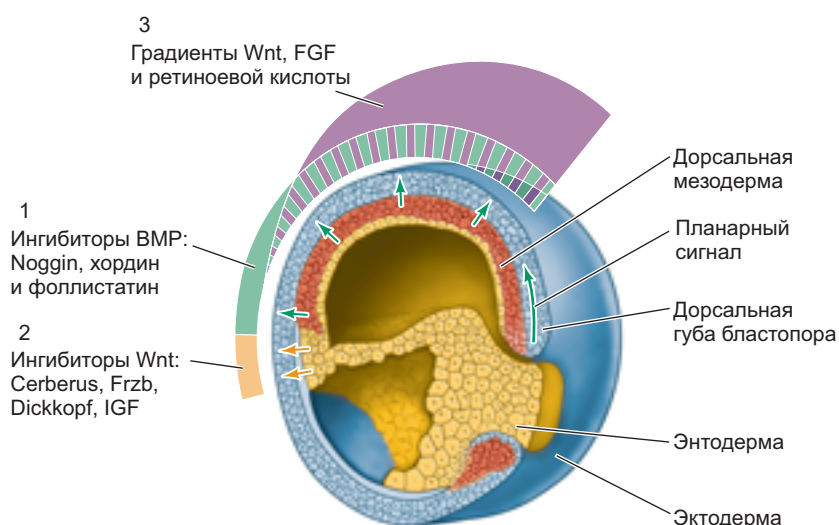


Рис. 11.25. Модель спецификации оси и функции организатора в гастреле шпорцевой лягушки. (1) Ингибиторы BMP, секретируемые тканью организатора (дорсальная мезодерма и энтодерма), блокируют образование эпидермиса, вентролатеральной мезодермы и вентролатеральной энтодермы. (2) Ингибиторы Wnt в передней части организатора (энто-мезодерма глотки) позволяют индуцировать образование головных структур. (3) Градиент факторов каудализации (белков Wnt, FGF и ретиноевой кислоты) впоследствии вызывает зональную экспрессию генов Нох, которые специфицируют области нервной трубки. (По данным: R. E. Keller. 1986. Из: *Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis*, Vol. 2, L. Browder (Ed.), pp. 241–327. Plenum: New York)

Но что ограничивает экспрессию *Xnr1* в левой части? В гл. 8 было показано, что лево-правая разметка улиток осуществляется под контролем Pitx2 и Nodal и регулируется белками цитоскелета, которые активны в течение первых циклов дробления. У лягушек можно наблюдать аналогичную ситуацию, где во время первых дроблений материнские Pitx2 и Nodal находятся, по всей видимости, под влиянием цитоскелета. Нарушения белков, ассоциированных с тубулином, в раннем развитии вызывают дефекты лево-правой асимметрии, к которым относят случайное расположение сердца и направление поворота кишки (Lobikin et al., 2012).

Хотя в раннем зародыше уже присутствуют признаки латеральности, очевидно, что для формирования лево-правой разметки необходим особый механизм: реснички управляют левонаправленным потоком внеклеточных факторов, в частности Nodal (Blum et al., 2014). У шпорцевой лягушки специальные реснички образуются на дорсальной губе blastopore во время поздних стадий гастрюляции (т. е. после первоначальной спецификации мезодермы); эта особая ресничная область была названа лево-правым организатором (ЛПО; Schweickert et al., 2007; Blum et al., 2009). Реснички расположены в задней области зародыша, в том месте, где все еще происходит формирование архентерона, они вращаются по часовой стрелке, что создает левонаправленный ток через центр удлинняющейся оси. Если заблокировать вращение ресничек, в мезодерме не возникает экспрессия *Xnr1* и проявляются дефекты латеральности (Walentek et al., 2013).

Один из ключевых генов, активируемых белком *Xnr1*, кодирует транскрипционный фактор Pitx2, который обычно экспрессируется только на левой стороне эмбриона. Pitx2 сохраняется на левой стороне в ходе развития сердца и кишки, осуществляя контроль их соответствующего положения. При введении *pitx2* в правую сторону эмбриона белковый продукт

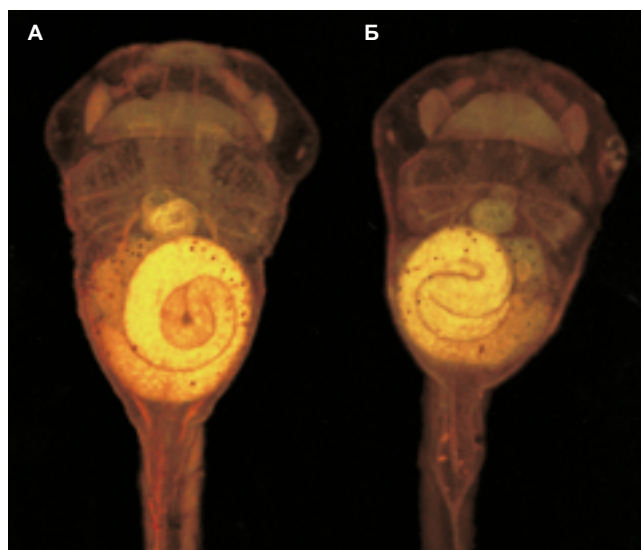
экспрессии оказывается как на левой, так и на правой стороне зародыша, а расположение сердца и направление спирали кишки определяются случайно (рис. 11.26; Ryan et al., 1998). Как мы увидим далее, путь, через который белок Nodal устанавливает лево-правую полярность через активацию Pitx2 на левой стороне, сохраняется во всех линиях позвоночных.

Раннее развитие *Danio rerio*

В последние годы *Danio rerio*, известная под названием рыба-зебра (zebrafish), составила компанию шпорцевой лягушке в качестве повсеместно изучаемого модельного объекта развития позвоночных (см. рис. 11.1Б). Несмотря на различия в характере деления (яйцеклетка *Xenopus* является голобластической, борозда деления проходит через всю клетку, тогда как богатая желтком яйцеклетка *Danio* меробластическая — только в небольшой части ее цитоплазмы образуются клетки), у *Xenopus* и *Danio* образование осей тела и спецификация клеток происходят схожим образом.

Почему именно рыбка *Danio*? Она удовлетворяет многим критериям отличной модельной системы для изучения биологии развития (см. гл. 1). Взрослая особь имеет небольшой размер, что позволяет содержать тысячи животных даже в маленькой лаборатории. *Danio* размножаются круглый год, имеют наружное оплодотворение и производят сотни зародышей в неделю. Как и в случае с лягушкой *Xenopus*, развитие вне организма матери обеспечивает полный доступ для манипуляций, однако, в отличие от эмбрионов лягушек, зародыши *Danio* прозрачны, что делает их удобными для изучения методами микроскопии. Помимо всего прочего, развитие у этих рыбок очень быстрое. Через 24 ч после оплодотворения у зародыша уже сформирована большая часть зачатков органов и он принимает характерную форму, напоминающую головастика (рис. 11.27; Granato and

Рис. 11.26. Белок Pitx2 определяет расположение сердца и направление поворота кишки. **А.** Головастик шпорцевой лягушки дикого типа (вид с брюшной стороны). Показаны правонаправленный изгиб сердца и поворот кишки против часовой стрелки. **Б.** Если эмбриону инъецируют Pitx2 таким образом, что этот белок оказывается в мезодерме как правой, так и левой стороны (а не только слева), направления изгиба сердца и поворота кишки будут определяться случайно и независимо относительно друг друга. Это воздействие может привести и к полной противоположности, как в данном случае, когда изгиб сердца направлен влево, а кишка повернута по часовой стрелке



Из: А. К. Ryan et al., 1998. *Nature* 394: 545–551, с разрешения J. C. Izpisua Belmonte

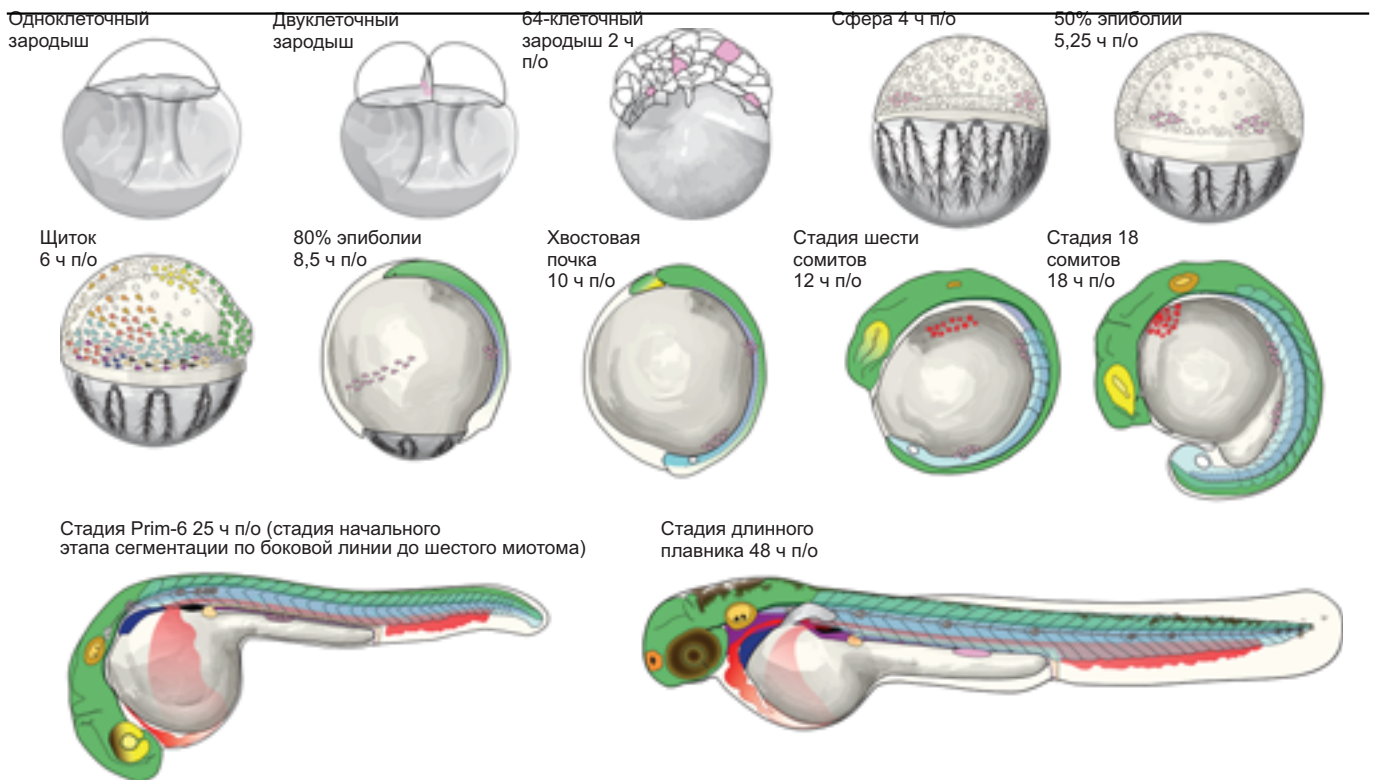


Рис. 11.27. Эмбриогенез *Danio* в течение 48 ч после оплодотворения (п/о). *Верхний ряд:* период дробления, в течение которого размер клеток уменьшается с каждым делением. Первичная зародышевая плазма (розовый) проявляется на двухклеточной стадии вдоль плоскости деления, хотя первые четыре обособленные первичные половые клетки (ППК) можно увидеть только на стадии 64 клеток. Четыре ППК создают четыре многоклеточных кластера (показаны два) к стадии сферы. На стадии сферы кроющий слой окутывает анимальное полушарие, простираясь до синцитиального желточного слоя, где многочисленные ядра и микротрубочки простираются к вегетативному полюсу. *Второй ряд:* гастрюляция с вегетативными рядами микротрубочек, которые помогают опускать эмбриональные клетки по желточной клетке благодаря прогрессирующей от 50 до 80% эпиболии, и до полного смыкания бластопора на стадии хвостовой почки. Дорсально-вентральная ось становится заметна на стадии щитка, где скопление клеток по средней линии создает видимый бугорок. Дорсальная сторона находится справа от каждого зародыша. Отдельные клетки и их траектории движения отображены на стадии щитка в тех локациях и теми цветами, которые указывают их будущий путь (см. Ключ). Пузырек Купфера (белая округлая структура на хвосте) служит ранним признаком роста постериорных структур и формирования лево-правой полярности. Индукция мезодермы во время гастрюляции приводит к появлению хорды (показана светло-лиловым и пунктирной линией) и сомитов, образующихся из параксиальной мезодермы (светло-голубые нашивкообразные поверхностно расположенные структуры, полупрозрачные на рисунке). Миграция ППК в гонаду завершается примерно через 24 ч п/о. Эктодермальные плакоды образуют глаз (желтый), слуховой орган (горчичный) и обонятельный орган (оранжевый). Развитие сердца и системы кровообращения начинается с двух групп клеток, расположенных с обеих сторон. Они мигрируют к средней линии и объединяются, образуя сердце (красным показана одна популяция клеток), после чего создается сложная система сосудов (показаны только дорсальная аорта и полая вена с постериорным кровяным островком). Показаны приблизительные локации развития кишечника, почек, печени и поджелудочной железы. Зачаточная боковая линия образуется из мозга примерно через 24 ч п/о и мигрирует в хвостовой конец по поверхности сомитов, по ходу своего пути формируя невромасты. Срок 48 ч п/о известен как стадия длинного плавника (long res) из-за наличия широкого грудного плавника (над желтком, серый). Несмотря на то что пигмент впервые появляется через 24,5 ч п/о в дорсальной области сетчатки (глаз, коричневый), количество пигмента туловища заметно увеличивается между первым и вторым днями развития (показаны наиболее дорсально расположенные меланоциты, через 48 ч п/о). (По данным: Michael J. F. Barresi © 2018.)

Ключ к цветовым обозначениям структур

- Желток (грудной плавник, 48 ч п/о)
- Кроющий слой
- ЖСС/микротрубочки
- ППК
- ЦНС
- Донная пластинка
- Эпидермис
- Хорда
- Сомиты
- Глаза (сетчатка, хрусталик)
- Слуховой орган (отолиты)
- Обонятельный орган (обонятельная ямка)
- Сердце/сосуды/кровь
- Печень
- Почка/пронефрос
- Желудочно-кишечный тракт/кишка
- Поджелудочная железа
- Пигмент
- Невромаст

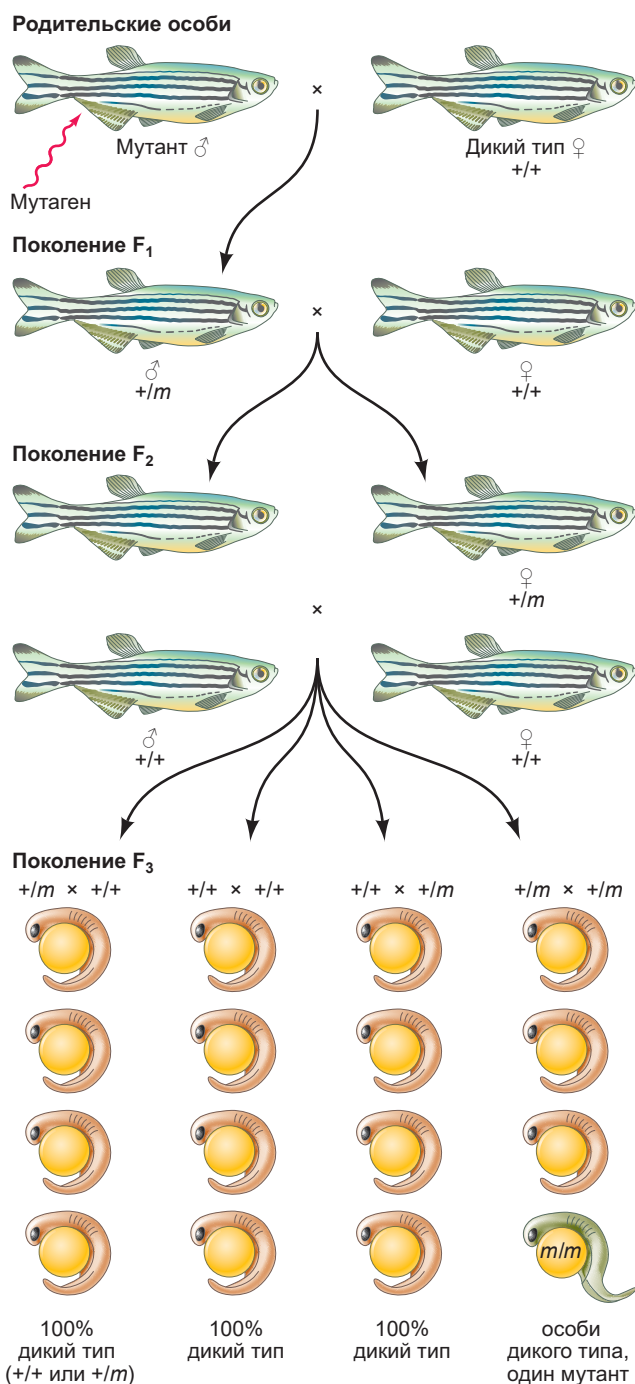


Рис. 11.28. Протокол скрининга для выявления мутаций развития *Danio*. Самца обработали мутагеном и спарили с самкой дикого типа (+/+). Если в сперме самца есть сперматозоиды, несущие рецессивный мутантный аллель (*m*), то некоторые особи из потомства F₁ унаследуют этот ген. Затем особи F₁ (здесь показан самец с мутантным аллелем *m*) скрещиваются с партнерами дикого типа. В результате скрещивания появляется поколение F₂, в котором некоторые самцы и самки несут рецессивные мутантные аллели. После спаривания рыбок F₂ появляются особи с мутантным фенотипом (По данным: P. Haffter et al., 1996. *Development* 123: 1–36.)

Nüsslein-Volhard, 1996; Langeland and Kimmel, 1997). Более того, возможность производить микроинъекции флуоресцентных красителей и нуклеиновых кислот в отдельные бластомеры позволила осуществлять эффективное картирование путей развития и производить генетические манипуляции для изучения функции генов и создания линий трансгенных рыб, у которых можно наблюдать флуоресценцию в определенных типах клеток.

Из-за большого числа эмбрионов, полученных в результате одного спаривания, рыбка *Danio* была первым позвоночным животным, изученным путем интенсивного мутагенеза. Метод, при котором родительскую особь подвергали действию мутагенов и избирательно размножали ее потомство, позволил ученым обнаружить тысячи мутаций в генах, правильная работа которых имеет ключевое значение для нормального развития. Традиционный метод генетического скрининга (аналогичный крупномасштабному для скринингов мухи *Drosophila*) начинается с обработки мужской особи химическим мутагеном, который вызывает случайные мутации в половых клетках. Затем каждого обработанного самца скрещивают с самкой дикого типа, в результате чего получают потомство F₁. Отдельные особи в поколении F₁ несут мутации, унаследованные от мужской особи. Если мутация доминантна, то она проявится уже в поколении F₁; если же она рецессивна, у рыб F₁ не проявляется мутантный фенотип, мутацию маскирует доминантный аллель дикого типа. Далее производителей из поколения F₁ скрещивают с рыбками дикого типа и получают поколение F₂, в котором мутантный аллель несут некоторые особи, как самки, так и самцы. Если оба родителя F₂ несут одну и ту же рецессивную мутацию, вероятность того, что у их потомства проявится мутантный фенотип, составляет 25% (рис. 11.28). Поскольку развитие рыбок *Danio* происходит в воде (а не под покровом непрозрачных оболочек или в утробе матери), легко наблюдать его аномальные стадии, а появляющиеся дефекты часто можно проследить вплоть до изменений в определенной группе клеток (Driever et al., 1996; Haffter et al., 1996). Современные высокопроизводительные методы генетического анализа и система редактирования генома CRISPR ускорили темпы изучения развития рыбки *Danio*, позволяя быстро вызывать, идентифицировать и множить мутации в определенных генах (Gonzales and Yeh, 2014; Varshney et al., 2015).

Зародыши *Danio* проницаемы для небольших молекул, растворенных в воде, это свойство позволяет тестировать те лекарства, которые могут оказаться вредными для развития позвоночных. Например, под воздействием этанола или ретиноевой кислоты в развитии рыбок *Danio* могут происходить нарушения, напоминающие эмбриональные синдромы у человека, вызываемые этими молекулами (Blader and Strähle, 1998). Эта возможность позволила как

крупным фармацевтическим компаниям, так и небольшим лабораториям проводить химический скрининг больших библиотек лекарственных соединений для определения их влияния на зародышевые и личиночные стадии развития рыбки. Их достижения уже способствовали разработке новых методов лечения человека. Как шутят исследователи *Danio*: «Рыбы — это на самом деле просто маленькие люди с плавниками» (Bradbury, 2004).

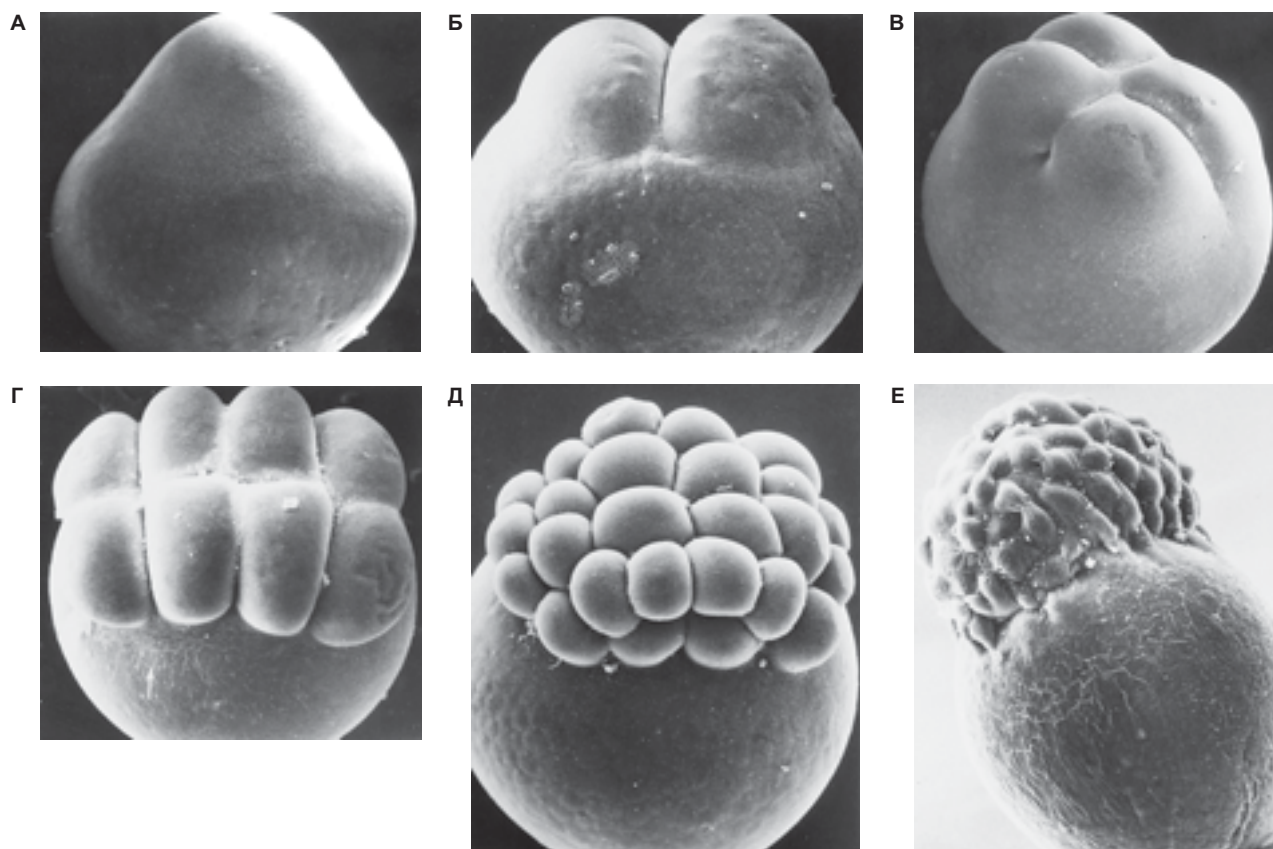
Дробление яйцеклетки *Danio rerio*: изучение процесса

Яйца большинства костистых рыб **телолецитальны**, т. е. большая часть их цитоплазмы заполнена желтком. Дробление может происходить только в **бластодиске**, узкой области цитоплазмы на анимальном полюсе, не содержащей желтка. Борозда клеточного деления не разделяет яйцеклетку полностью, из-за чего этот тип дробления называют **меробластическим** (от греч. *meros* — часть). Поскольку только бластодиск участвует в образовании зародыша, такой

тип меробластического дробления называют **дискоидальным**.

Фотографии, полученные методом сканирующей электронной микроскопии, прекрасно иллюстрируют характерное неполное деление яйцеклеток при дискоидальном меробластическом дроблении (**рис. 11.29**). Волны кальция, возникающие при оплодотворении, стимулируют сокращение актинового цитоскелета, вытесняя свободную от желтка цитоплазму на анимальный полюс яйцеклетки. В результате сферическая яйцеклетка становится грушевидной с апикально расположенным бластодиском (Leung et al., 1998; 2000). Для рыбок характерно появление большого количества волн кальция, которые впоследствии управляют процессами клеточных делений. Ионы кальция имеют решающее значение для митотических делений. Они объединяют движения митотического веретена с движениями актинового цитоскелета, углубляют борозду дробления и восстанавливают мембрану после отделения бластомеров (Lee et al., 2003).

Первыми клеточными делениями часто являются меридиональное и экваториальное. Они протекают быстро, каждое занимает около 20 мин. Первые 10 делений синхронны и приводят к образованию бугорка



Из: H. W. Beams and R. G. Kessel, 1976. *Am Sci* 64: 279–290, с разрешения авторов

Рис. 11.29. Дискоидальное меробластическое дробление в яйцеклетке *Danio*. **А.** Одноклеточный эмбрион. Бугорок на вершине клетки — бластодиск. **Б.** Двуклеточный эмбрион. **В.** Четырехклеточный эмбрион. **Г.** Восьмиклеточный эмбрион, в котором сформированы два ряда по четыре клетки. **Д.** 32-клеточный эмбрион. **Е.** 64-клеточный эмбрион с бластодиском на желточной клетке

из клеток на анимальном полюсе крупной **желточной клетки**. Бугорок представляет собой **бластодерму**. Первоначально между всеми клетками и подлежащей желточной клеткой поддерживается цитоплазматическая связь, так что молекулы умеренного размера (17 кДа) могут свободно проходить из одного бластомера в другой (Kimmel and Law, 1985; Kane and Kimmel, 1993). Примечательно, что, когда дочерние клетки мигрируют далеко друг от друга, они зачастую сохраняют эти длинные мостики, которые держат их вместе (Сапераро et al., 2011).

Мутации материнского эффекта показали важность белков и мРНК ооцитов в определении зародышевой полярности, процессах клеточных делений и формировании оси (Dosch et al., 2004; Langdon and Mullins, 2011). Как и у лягушек, микротрубочки у рыб представляют собой основные пути, по которым движутся цитоплазматические факторы, определяющие клеточную идентичность, а мутации в ооците, влияющие на формирование микротрубочкового цитоскелета, препятствуют нормальному расположению борозды дробления и локализации необходимых мРНК у ранних зародышей (Kishimoto et al., 2004). Эмбрионы рыб, как и многие другие зародыши, претерпевают переход к средней бластуле (в ходе приблизительно десятого деления дробления у *Danio*), и, когда начинается транскрипция зиготического генома, деление клеток замедляется, а их движения становятся видимыми (Kane and Kimmel, 1993). Как уже говорилось в гл. 3 (см. рис. 3.21 и 3.25), для перехода к зиготическому геному необходима работа запасенных материнских микроРНК (например, miR430), которые постепенно ослабляют материнские сигналы и тем самым способствуют быстрой передаче ответственности за транскрипцию зиготическому геному. К этому времени в яйце рыб можно выделить три различные клеточные популяции. Первая представлена **желточным синцитиальным слоем**, или ЖСС (Agassiz and Whitman, 1884; Carvalho and Heisenberg, 2010). Несмотря на то что клетки и ядра, входящие в состав ЖСС, не вносят вклад в формирование зародыша, ЖСС необходим для образования организатора у рыб, информирования разметки мезодермы и контролирования подворачивания эктодермы на поверхности зародыша (Chu et al., 2012). ЖСС образуется на десятом клеточном цикле, когда клетки вегетативного края бластодермы сливаются с подлежащей желточной клеткой. В результате слияния образуется кольцо из ядер в той части цитоплазмы желточной клетки, которая находится непосредственно под бластодермой. Позднее, по мере того, как бластодерма разрастается в вегетативном направлении, окружая желточную клетку, некоторые ядра желточного синцития перемещаются под бластодерму, где образуют **внутренний ЖСС**, тогда как другие ядра, оставаясь впереди края бластодермы, будут двигаться в вегетативном направлении, образуя **внешний ЖСС** (рис. 11.30А, Б).

Вторая клеточная популяция, выделяемая при переходе к средней бластуле, — это **кроющий слой** (КС). В него входят самые поверхностные клетки бластодермы, образующие эпителиальный слой толщиной в одну клетку. КС представляет собой защитную оболочку, которая сбрасывается через две недели. Она позволяет зародышу развиваться в гипотоническом растворе (например, в пресной воде), в котором в противном случае клетки могли лопнуть (Fukazawa et al., 2010). Между КС и ЖСС располагается третья линия бластомеров — глубоинные клетки, дающие начало собственно эмбриону.

Развитие клеток ранней бластодермы не детерминировано, а исследования клеточных линий (в которых недиффундирующий флуоресцентный краситель вводят в клетку и отслеживают ее потомков) показывали, что в ходе дробления большинство клеток перемешивается случайным образом. Более того, любой из ранних бластомеров может дать начало клеткам, дифференцирующимся в непредсказуемом направлении (Kimmel and Warga, 1987; Helde et al., 1994). Незадолго до начала гаструляции статус клеток бластодермы становится фиксированным, что позволяет создать карту презумптивных зачатков. В данный момент развития существует большая вероятность предсказать, каким тканям дадут начало клетки в определенных областях эмбриона (рис. 11.30В), несмотря на то что эти клетки остаются пластичными и их развитие можно изменить, если ткань будет пересажена к другому индуктору.

Гаструляция и формирование зародышевых листков

Все три слоя бластодермы рыбки *Danio* подвергаются эпиболии. Эпиблия клеток бластодермы над желтком является первым гаструляционным клеточным движением у рыб; считается, что этот процесс находится под контролем как материнских белков (таких как эомезодермин), так и новых белков, транскрипция которых происходит в ядрах ЖСС (Du et al., 2012). Благодаря интеркаляции глубоких клеток эпибласта в более поверхностно расположенные слои, эпибласт радиально разрастается, подобно тому, как эпиблия протекает у лягушки *Xenopus* (Warga и Kimmel, 1990). Как мы обсуждали в гл. 4, за радиальную интеркаляцию отвечает дифференциальная экспрессия Е-кадгерина (Kane et al., 2005; McFarland et al., 2005). Эта клеточная интеркаляция вызывает уплощение «купола» клеток бластодермы (рис. 11.31А).

Развитие эпиболии

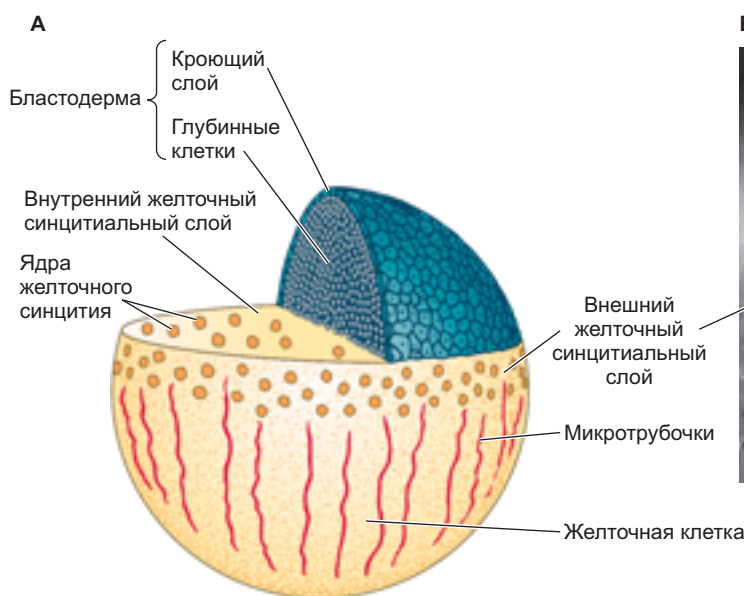
Когда около половины желтка покрыто клетками эпибласта, внутренний и внешний ЖСС иницируют

новый набор движений (Bruce, 2016). Ядра клеток ЖСС делятся таким образом, что некоторые из них (составляющие внешний ЖСС) остаются в верхнем кортексе желточной клетки, тогда как ядра внутреннего ЖСС оказываются под бластодермой. Кроющий слой, будучи плотно соединенным с внутренним ЖСС при помощи Е-кадгерина и плотных контактов (Shimizu et al., 2005a; Siddiqui et al., 2010), тянется за ним в вентральном направлении, в то время как ядра внутреннего ЖСС мигрируют по нисходящей. То, что вегетативная миграция края бластодермы зависит от эпиболлии ЖСС, можно продемонстрировать, разорвав контакты между ЖСС и КС. После этого КС и глубинные клетки возвращаются к вершине желтка, а ЖСС продолжает расширяться по поверхности желточной клетки (Trinkaus 1984, 1992).

Миграция ЖСС в вегетативном направлении зависит частично от расширения этого слоя путем

деления и интеркаляции клеток и частично от сети цитоскелета в желточной клетке (Lepage and Bruce, 2010; Bruce, 2016). На границе между ЖСС и КС, во внешнем ЖСС, образуется сократительное кольцо. Оно делает тоньше место соединения ЖСС и КС на вегетативном полушарии посредством сокращения и трения (Behrndt et al., 2012).

Тем временем ядра внешнего ЖСС, вероятно, мигрируют вдоль микротрубочек, выровненных вдоль анимальновегетативной оси желточной клетки, и тянут за собой внутренний ЖСС и сопровождающий его КС над желточной клеткой. (Следует отметить, что радиация или вещества, блокирующие полимеризацию тубулина, замедляют эпиболлию; Strähle and Jesuthasan, 1993; Solnica-Krezel and Driever, 1994.) В конце гастрюляции бластодерма полностью покрывает всю желточную клетку.



Из: J. P. Trinkaus, 1993, *J Exp Zool* 265: 258–284, с разрешения J. P. Trinkaus

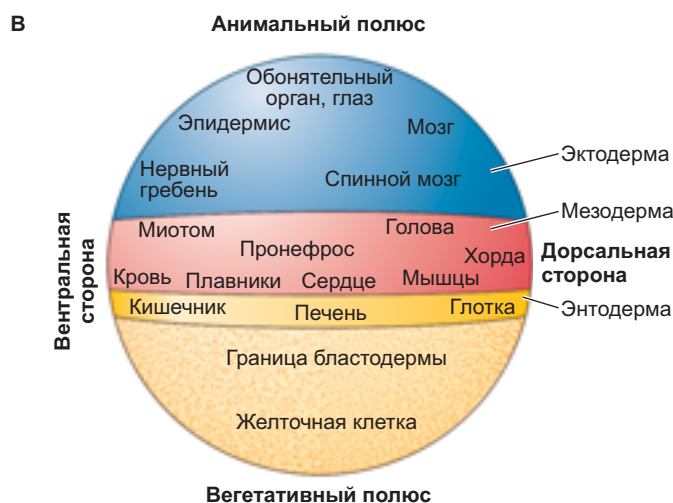


Рис. 11.30. Бластула рыбы. **А.** До начала гастрюляции глубинные клетки окружены клетками кроющего слоя (КС). Плоская анимальная поверхность желточной клетки содержит ядра желточного синцитиального слоя (ЖСС). Микротрубочки идут через желточную цитоплазму и внешний ЖСС. **Б.** Фотография зародыша гольяна *Fundulus* на стадии поздней бластулы, демонстрирующая внешний ЖСС. Ядра этих клеток высвободились в желточную из краевых клеток бластодермы. **В.** Карта презумптивных зачатков зародыша рыбы, представленного глубинными клетками после завершения перемешивания. На рисунке сбоку отмечено перспективное значение только некоторых органов. (По данным: L. Solnica-Krezel and W. Driever, 1994. *Development* 120: 2443–2455; рис. В из: С. В. Kimmel et al, 1995. *Dev Dyn* 203: 253–310; по данным: С. В. Kimmel et al., 1990. *Development* 108: 581–594.)

Интернализация гипобласта

После того как клетки бластодермы покрыли примерно половину желточной клетки *Danio*, на краю глубинных клеток появляется утолщение. Утолщение называют **зародышевым кольцом**, и оно состоит из поверхностного слоя, эпибласта (который впоследствии станет эктодермой) и внутреннего слоя, **гипобласта** (который образует энтодерму и мезодерму). Гипобласт образуется в результате синхронной «волны» интернализации (Keller et al., 2008), которая имеет некоторую схожесть с ингрессией (особенно в дорсальной области) (Carmany-Rampey and Schier, 2001) и некоторые черты инволюции (особенно в будущих вентральных областях). Таким образом, поскольку клетки бластодермы вокруг желтка подвергаются эпиболлии, они тоже интернализируют клетки на краю бластодермы, тем самым образуя гипобласт. Клетки эпибласта (презюмтивная эктодерма) не подворачиваются, в отличие от глубинных клеток — будущей мезодермы и энтодермы (рис. 11.31Б–Г). По мере того как клетки гипобласта интернализи-

руются, будущие клетки мезодермы (большая часть клеток гипобласта) первоначально мигрируют в вегетативном направлении, одновременно пролиферируя, образуя новые клетки мезодермы. Позже они меняют направление миграции и продвигаются к анимальному полюсу. В то же время энтодермальные клетки-предшественники, по-видимому, перемещаются над желтком в случайном направлении (Pézeron et al., 2008). Координацию миграции и спецификации клеток осуществляют физические силы, а не химические вещества. Если кортикальный цитоскелет разрушить при помощи воздействия определенных соединений, клетки не специфицируются и в них не активируются мезодермальные гены. Однако, если в клетки ввести магнитные частицы до воздействия, ткань можно механически тянуть вокруг эмбриона при помощи магнита. Клетки не инволюируют, однако активируются мезодермальные гены. Таким образом, в ходе нормального развития инволюция может координировать эпиболлию и спецификацию клеток действием механического напряжения (рис. 11.32; Brunet et al., 2013).

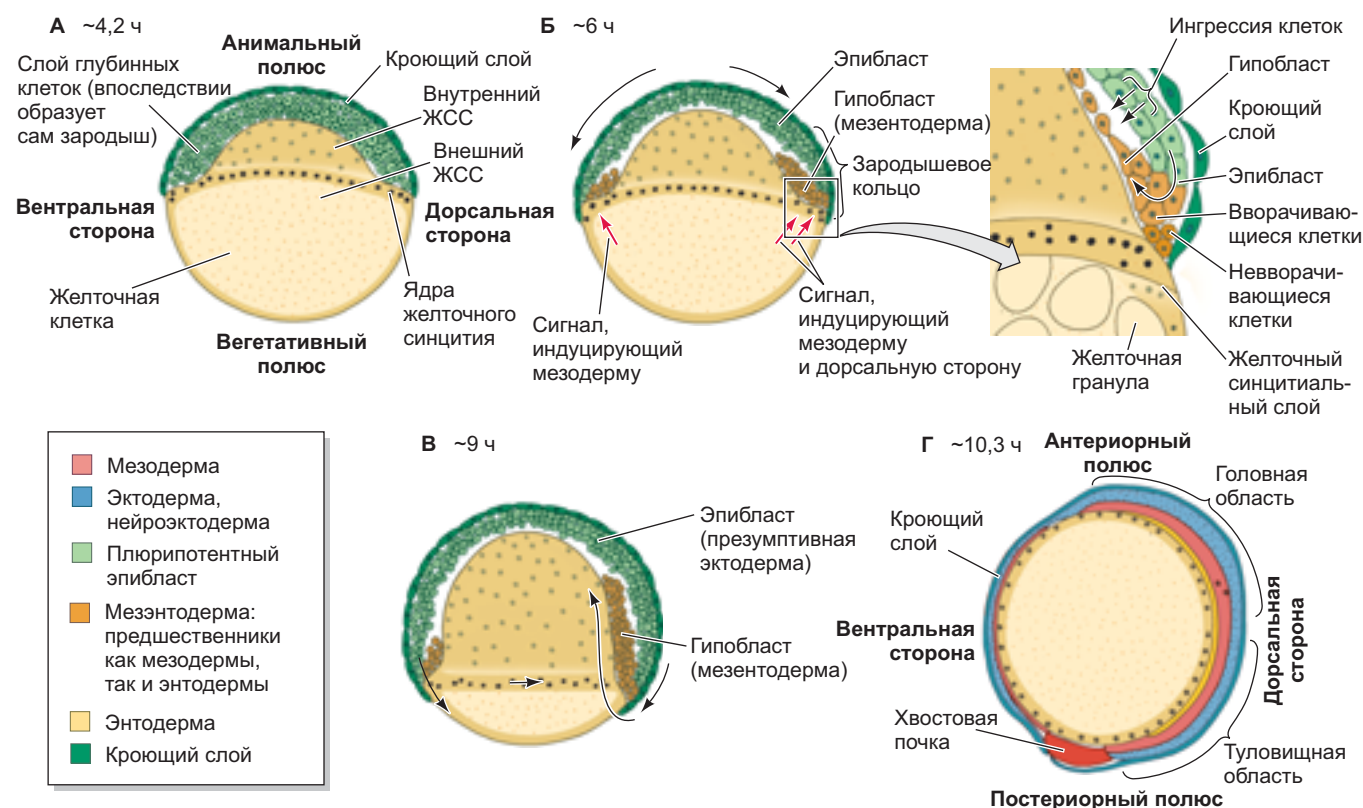


Рис. 11.31. Клеточные движения во время гастрюляции у рыбок *Danio*. **А.** Бластодерма на стадии 30% эпиболлии (~4,2 ч). **Б.** Образование гипобласта либо в результате инволюции края обрастающей бластодермы, либо путем деламинации и ингрессии клеток из эпибласта (~6 ч). Краевая область крупным планом справа. **В.** Когда эктодермальная эпиболлия близится к завершению, гипобласт, несущий предшественники мезодермы и энтодермы, начинает окружать желток (~9 ч). **Г.** Завершение гастрюляции (~10,3 ч). Присутствие всех трех зародышевых листков (энтодерма показана желтым, эктодерма — синим, мезодерма — красным). (По данным: W. Driever, 1995. *Curr Opin Genet Dev* 5: 610–618; L. Carvalho and C. P. Heisenberg, 2010. *Trends Cell Biol* 20: 586–592.)

Зародышевый щиток и нейральный киль

Как только сформировался гипобласт, на будущей дорсальной стороне эмбриона в результате интеркаляции клеток эпибласта и гипобласта образуется локальное утолщение, которое носит название **зародышевого щитка** (Schmitz and Campos-Ortega, 1994). Здесь клетки сходятся, затем происходит удлинение в anteriорном направлении, а в итоге — сужение вдоль дорсальной средней линии (рис. 11.33А). Это конвергентное удлинение в гипобласте впоследствии образует предшественник хорды хордомезодерму (рис. 11.33Б, В; Trinkaus, 1992). Данный процесс аналогичен конвергентному удлинению, наблюдаемому у шпорцевой лягушки, а его образование происходит аналогичным образом за счет планарной клеточной полярности, опосредованной сигнальным путем Wnt (Vervenne et al., 2008).

Как будет понятно далее, зародышевый щиток функционально эквивалентен дорсальной губе

бластопора амфибий, так как при трансплантации в другой эмбрион он может выступать организатором вторичной эмбриональной оси (Oppenheimer, 1936; Но, 1992). Клетки, прилегающие к хордомезодерме, — клетки параксиальной мезодермы — служат предшественниками мезодермальных сомитов (см. гл. 17). За счет сопутствующего конвергентного удлинения в эпибласте презумптивные нейральные клетки попадают из эпибласта в дорсальную срединную линию, где они образуют **нейральный киль**. Нейральный киль, изначально представленный полоской нейральных клеток-предшественников, лежащих на протяжении аксиальной и параксиальной мезодермы, затем образует щелевидный просвет, становясь нервной трубкой, которая впоследствии попадает внутрь зародыша. Клетки, остающиеся в эпибласте, образуют эпидермис. На вентральной стороне (см. рис. 11.33Б) кольцо гипобласта движется к вегетативному полюсу, мигрируя непосредственно под эпибласт, который в это время претерпевает

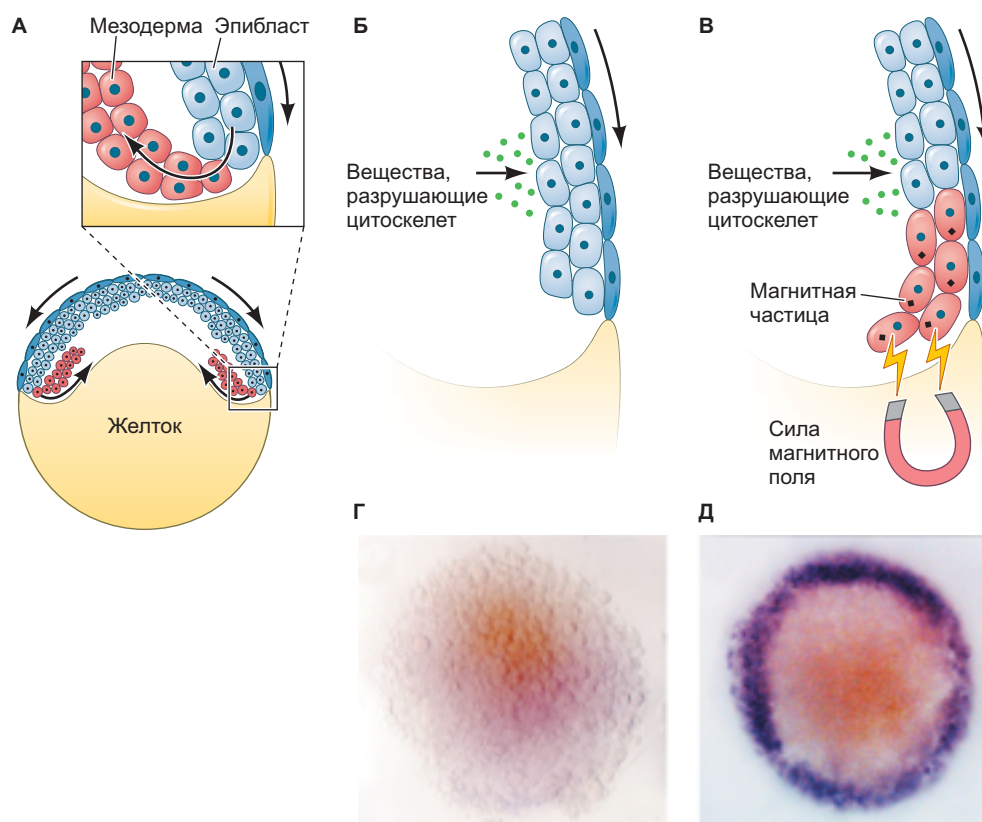


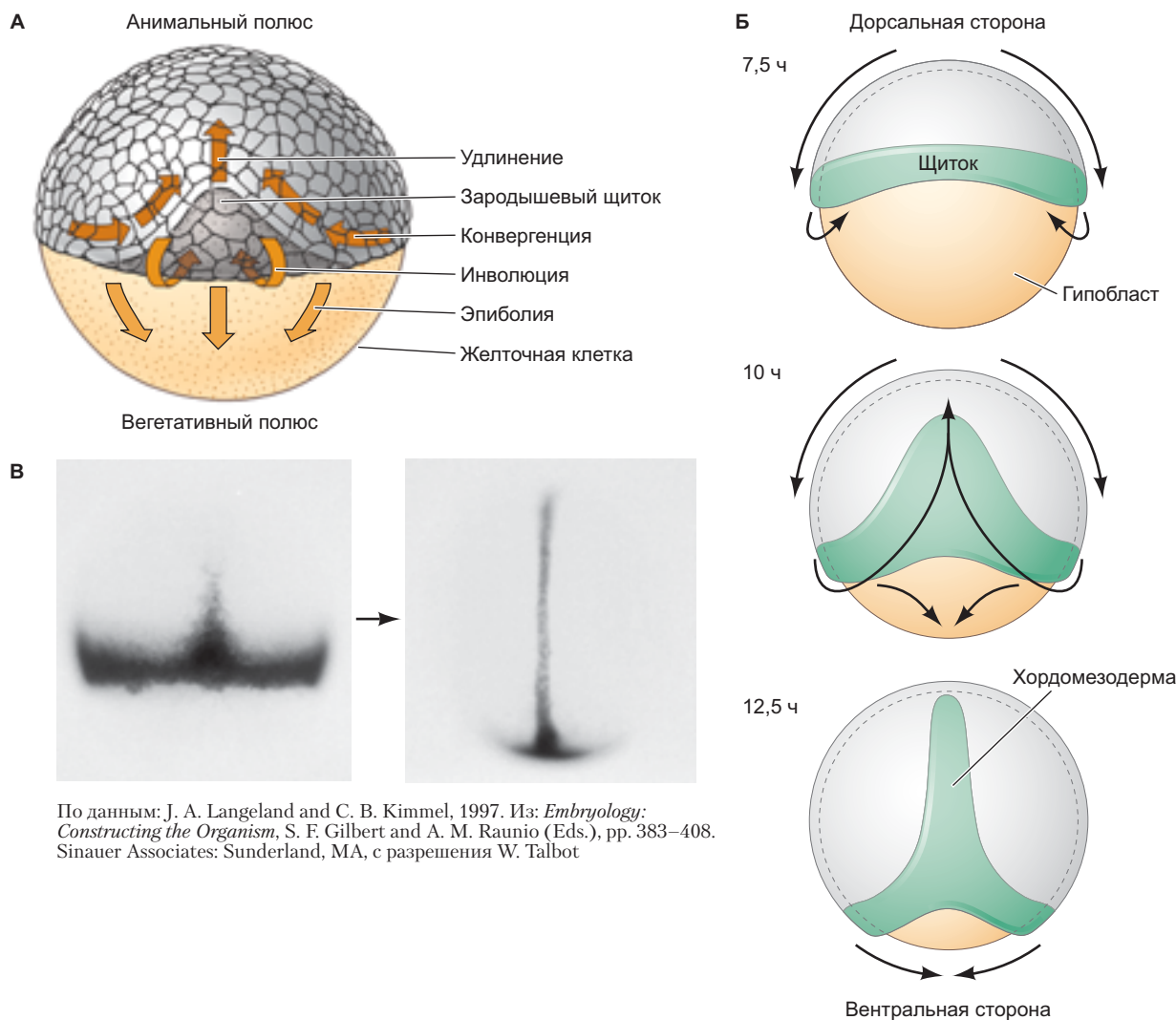
Рис. 11.32. Растяжение клеток эпибласта рыбки *Danio* приводит к образованию мезодермы. А. В ходе эпиболии клетки на границе претерпевают структурные изменения, а затем инволюируют. При этом активируются мезодермальные гены (красный). Б. Если кортикальный цитоскелет не сокращается, клетки аниимальной шапочки остаются эктодермальными и не инволюируют. В. Однако, если к этим клеткам применить силу магнитного поля, экспрессируются мезодермальные гены. Г, Д. Циркумполярные изображения Б и В показывают экспрессию мезодермального гена *no tail* (гомолога гена *brachyury* у *Danio*). Г. Экспрессия *no tail* блокируется, если не происходит инволюция. Д. Экспрессия *no tail*, вызванная растяжением клеток и последующей инволюцией. (Рис. А–В по данным: S. Piccolo, 2013. *Nature* 504: 223–225.)

Рис. 11.32. Растяжение клеток эпибласта рыбки *Danio* приводит к образованию мезодермы. А. В ходе эпиболии клетки на границе претерпевают структурные изменения, а затем инволюируют. При этом активируются мезодермальные гены (красный). Б. Если кортикальный цитоскелет не сокращается, клетки аниимальной шапочки остаются эктодермальными и не инволюируют. В. Однако, если к этим клеткам применить силу магнитного поля, экспрессируются мезодермальные гены. Г, Д. Циркумполярные изображения Б и В показывают экспрессию мезодермального гена *no tail* (гомолога гена *brachyury* у *Danio*). Г. Экспрессия *no tail* блокируется, если не происходит инволюция. Д. Экспрессия *no tail*, вызванная растяжением клеток и последующей инволюцией. (Рис. А–В по данным: S. Piccolo, 2013. *Nature* 504: 223–225.)

эпиболию над желточной клеткой. В итоге кольцо смыкается на вегетативном полюсе, завершая интернализацию тех клеток, которые станут мезодермой и энтодермой (Keller et al., 2008).

Благодаря различным механизмам яйца шпорцевой лягушки и рыбки *Danio* достигают одного и того же состояния: они стали многоклеточными,

они претерпели гастрюляцию, и они расположили свои зародышевые слои так, что эктодерма находится снаружи, энтодерма находится внутри, а мезодерма лежит между ними. Далее мы увидим, что рыбки *Danio* формируют свои оси тела способами, схожими с таковыми у шпорцевой лягушки, с использованием очень похожих молекул.



По данным: J. A. Langeland and C. B. Kimmel, 1997. Из: *Embryology: Constructing the Organism*, S. F. Gilbert and A. M. Raunio (Eds.), pp. 383–408. Sinauer Associates: Sunderland, MA, с разрешения W. Talbot

Рис. 11.33. Конвергенция и удлинение в гастреле рыбки *Danio*. **А.** Гастрюляционные движения рыбки *Danio* (вид с дорсальной стороны). Блестдерма распространяется по желтку за счет эпиболии; гипобласт возникает в результате инволюции и ингрессии; за счет конвергенции и удлинения клетки гипобласта и эпибласта попадают на дорсальную сторону, образуя эмбриональный щиток. В области щитка хордомезодерма удлиняется в сторону анимального полюса в результате интеркаляции. **Б.** Модель формирования мезентодермы (гипобласта). Числами обозначены часы после оплодотворения. На будущей дорсальной стороне интернализованные клетки подвергаются конвергентному удлинению с образованием хордомезодермы (хорды) и прилегающей к ней параксиальной (сомитической) мезодермы. В то же время на вентральной стороне зародыша клетки гипобласта мигрируют вместе с подворачивающимся эпибластом к вегетативному полюсу, где в итоге сходятся. **В.** Конвергентное удлинение хордомезодермы из клеток гипобласта. В этих клетках можно наблюдать экспрессию гена *no tail* (темные области), кодирующего фактор транскрипции T-box. (Рис. Б из: P. J. Keller et al, 2008. *Science* 322: 1065–1069.)

Процесс формирования дорсально-вентральной оси

Как упомянуто выше, зародышевый щиток рыбы гомологичен дорсальной губе бластопора амфибий и критически необходим для установления дорсально-вентральной оси. Ткань щитка может преобразовывать латеральную и вентральную мезодерму (предшественники крови и соединительной ткани) в дорсальную мезодерму (хорду и сомиты), а также может индуцировать образование нейральной (а не эпидермальной) ткани из эктодермы. Способность к преобразованию ткани была продемонстрирована в экспериментах по трансплантации, в которых зародышевый щиток эмбриона на стадии ранней гаструлы был пересажен на вентральную сторону другого зародыша (рис. 11.34; Oppenheimer, 1936; Koshida et al., 1998). В результате образовывались две оси, разделяющие общую желточную клетку. Несмотря на то что прехордальная пластинка и хорда были получены из материала донорского зародышевого щитка, другие органы вторичной оси образовывались из тех тканей хозяина, которые в норме должны были формировать вентральные структуры. Образование новой оси было индуцировано донорскими клетками.

Подобно губе бластопора у амфибии, зародышевый щиток образует прехордальную пластинку и хорду развивающегося зародыша. Клетки прехордальной пластинки первыми подвергаются инволюции и мигрируют к анимальному полюсу (Dumortier et al., 2012). Презумптивная прехордальная пластинка и хорда отвечают за индукцию эктодермы к образованию нейроэктодермы, чем очень напоминает гомологичные структуры у амфибий. Кроме того, у рыбок *Danio* обнаружены те же сигнальные молекулы, выделяемые щитком/организатором, что и у шпорцевой лягушки. Белки Nodal и BMP, члены суперсемейства TGF β , индуцируют дифференцировку зародышевых листков вдоль дорсально-вентральной оси, а секретируемые щитком/организатором Noggin, хордин и фоллистатин служат для блокирования вентральной индукции и стимулирования развития нервной системы (рис. 11.35).

Губа бластопора у рыб

Вся губа бластопора целиком является еще одним важным источником организации, что, по всей видимости, уникально для рыб. Напомним, что бластопор рыбы распространяется по всей желточной клетке. При трансплантации в вентральную область края бла-

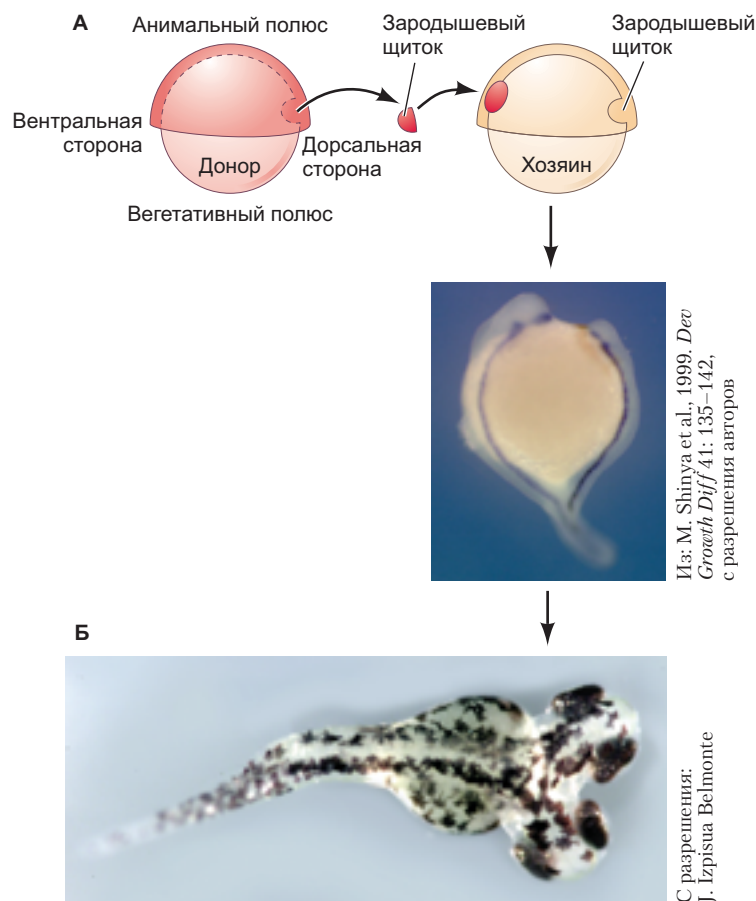


Рис. 11.34. Зародышевый щиток как организатор у зародышей рыб. **А.** Донорский зародышевый щиток (около 100 клеток, взятых от окрашенного эмбриона) был трансплантирован в другого эмбриона-хозяина на той же стадии ранней гаструлы. В результате сформировались две зародышевые оси, соединенные с желточной клеткой хозяина. Обе оси, показанные на фотографии, окрашены на мРНК гена *sonic hedgehog*, экспрессию которого можно наблюдать в вентральной средней линии тела зародыша. (Зародыш справа — вторичная ось.) **Б.** Тот же эффект имеет активация β -катенина в ядрах зародыша в тех областях, которые противоположны зонам формирования зародышевого щитка. (Рис. А из: M. Shinya et al, 1999, *Dev Growth Diff* 41: 135–142.)

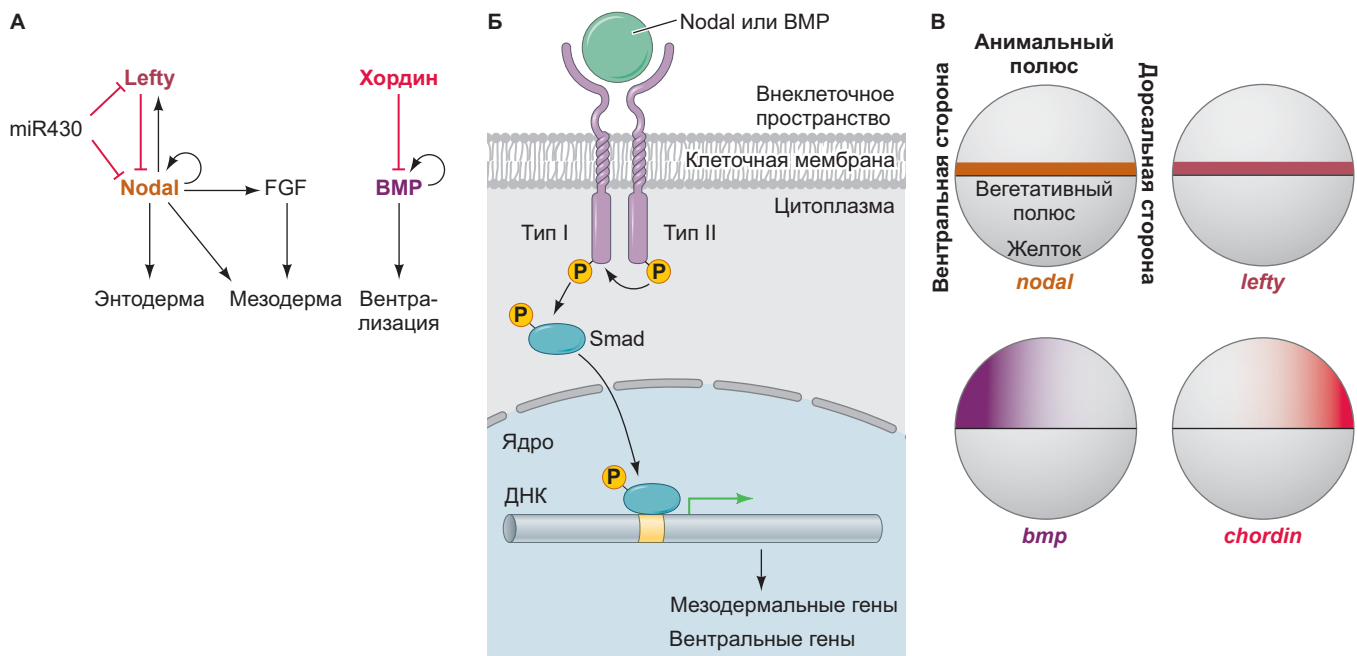


Рис. 11.35. Сигналинг BMP и Nodal при формировании оси рыбки *Danio*. **А.** Генетические взаимодействия при спецификации оси у *Danio*. **Б.** Действие как Nodal, так и BMP опосредовано фосфорилированным Smad. Nodal способствует спецификации энтодермы и мезодермы, в то время как BMP индуцирует те клетки зародышевых листков, которые должны стать вентральными (эту функцию ингибирует хордин). **В.** Схема паттернов экспрессии генов, детерминирующих образование оси в гастреле *Danio*. (По данным: K. W. Rogers and P. Müller, 2018. *Dev Biol* 447: 14–23.)

стопора дорсальная губа (щиток) будет индуцировать образование головных структур. Тем не менее зародышевый щиток не может индуцировать формирование каких-либо структур из соседней ткани при его пересадке на анимальную шапочку другой бластулы, содержащую полностью недифференцированные клетки. Если трансплантат из вентральной губы бластопора пересадить на клетки анимальной шапочки, образуется хорошо организованный хвост, который содержит эпидермис, сомиты и нервную трубку, однако в нем будет отсутствовать дорсальная мезодерма (Agathon et al. 2003). Индукция большей части этой структуры происходит из ткани хозяина. Таким образом, вентральная губа бластопора у *Danio* является «организатором хвоста». При наличии ткани хорды клетки латеральных губ бластопора будут индуцировать образование структур туловища и задней части головы. Более того, эти трансплантированные ткани не экспрессируют белки BMP, Wnt или их антагонисты.

Разделение сил Nodal и BMP во время детерминации оси

Похоже, что в дополнение к классическому организатору-щитку (см. рис. 11.34), вся губа бластопора участвует в формировании постериорных структур головы, а также туловища и хвоста, однако действует при

этом иным способом. Вторым набором определяющих ось факторов, по-видимому, является двойной градиент белков Nodal и BMP (Fauny et al., 2009; Thisse and Thisse, 2015). Вдоль губы бластопора, от вентрального до дорсального края, образуется непрерывный градиент в соотношении активности BMP к Nodal. У белка BMP самую высокую концентрацию можно наблюдать на вентральном крае. Она снижается в дорсально-латеральном направлении и приближается к нулю в самом дорсальном отделе, где активен только Nodal. Таким образом, каждая область губы бластопора характеризуется определенным соотношением активности BMP к Nodal. Примечательно, что можно получить целиком эктопическую ось путем инъекции мРНК *nodal* в один из бластомеров анимальной шапочки, а в другой бластомер той же области — мРНК *bmp* (Xu et al., 2014). Между этими клетками образуется градиент сигнальных молекул, а соседние клетки отвечают на него образованием новой оси (рис. 11.36).

Более того, вводя различное количество мРНК *bmp* и *nodal* в одну клетку анимальной шапочки бластулы, можно имитировать активность губы бластопора. Инъекции мРНК с высоким соотношением *bmp* к *nodal* вызывают образование новых хвостов, растущих от анимального полюса зародыша. В этих клетках продуцируется постериорный морфоген Wnt8. Инъекция мРНК с пониженным соотношением *bmp* к *nodal* индуцирует образование вторичного туловища

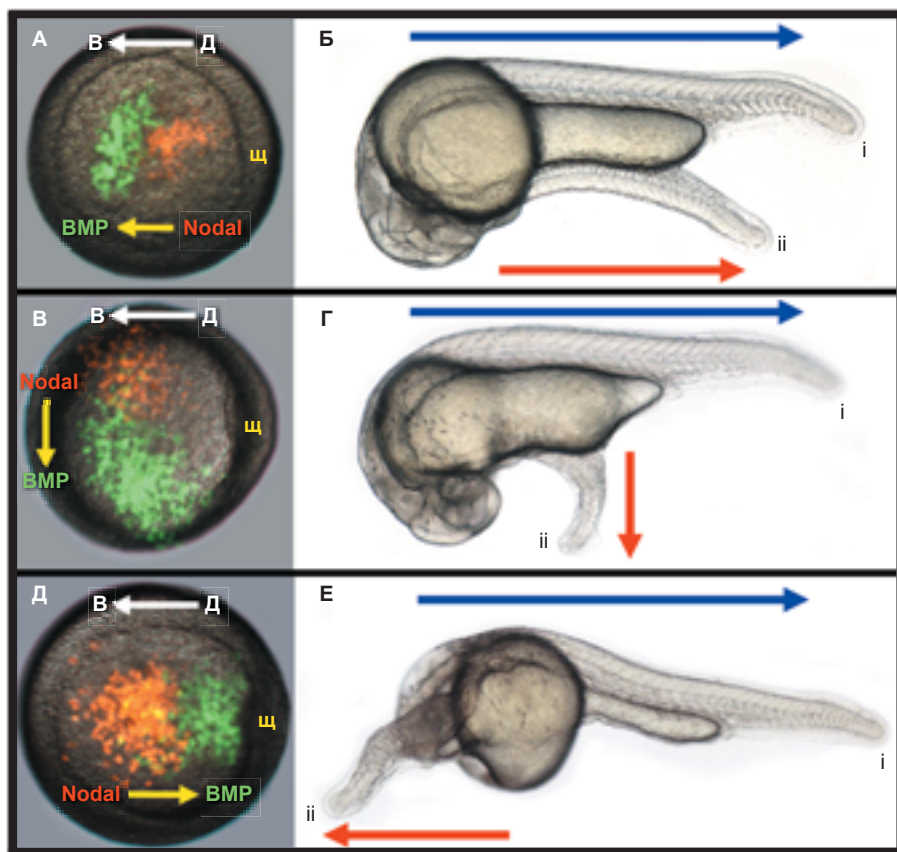
ща из анимальных клеток. Когда *bmp* и *nodal* вводят в одинаковых количествах, возникают постериорные структуры головы (Thisse et al., 2000). Как упоминалось ранее, у шпорцевой лягушки белки Nodal имеют решающее значение для формирования организатора; у рыбок *Danio* эктопическая экспрессия Nodal на вентральном крае бластопора преобразует вентральную губу бластопора в щиток, вызывая образование целой вторичной оси. Щиток у *Danio* может быть «головным организатором», в то время как клетки губы бластопора, расположенные на 180° от щитка, становятся «организатором хвоста».

Двигателем для интеграции осей BMP — Хордин и BMP — Nodal, по-видимому, служит β-катенин. Как и у *Xenopus*, β-катенин активирует гены *nodal*. Кроме того, β-катенин стимулирует экспрессию генов, кодирующих белки FGF и другие факторы, подавляющие экспрессию BMP и Wnt на дорсальной стороне эмбриона, и в то же время активирует гены *goosecoid*, *noggin* и *dickkopf* в этой зоне (Sam-path et al., 1998; Gritsman et al., 2000; Schier and Talbot, 2001; Solnica-Krezel and Driever, 2001; Fürthauer et al., 2004; Tsang et al., 2004). Как и у шпорцевой лягушки, β-катенин накапливается в ядрах именно

тех клеток, которым суждено образовать дорсальные структуры (Langdon and Mullins, 2011). По всей видимости, этот процесс регулирует материнский белок Wnt, аналогично тому, как это происходит у *Xenopus*,

Загадки развития

Все оси зародыша развиваются одновременно. Как согласуется время определения пути развития дорсальных и вентральных клеток с временем развития передне-задней и лево-правой осей? Необходимо также учесть, что в ходе этих событий происходят и морфологические изменения. В данной главе мы описывали гастрюляцию и формирование осей отдельно только потому, что это облегчает понимание их механизмов. На самом же деле эти процессы развиваются вместе как часть целого. Так может ли физическая природа морфогенетических движений каким-то образом помогать определить время развития осей? Если эта тема вас заинтересовала, обратитесь к исследованиям Мэри Маллинс (например, Tuazon and Mullins, 2015 и другие работы).



Из: Р. Е. Ху et al., 2014. *Science* 344: 87–89, с разрешения С. Thisse

Рис. 11.36. Корреляция между относительным положением BMP- и Nodal-секретирующих клонов и ориентацией вторичной эмбриональной оси, индуцированной в анимальной шапочке. **А, Б.** Если вектор Nodal-BMP (желтая стрелка; рис. А) параллелен дорсально-вентральной оси (белая стрелка) у границы тела зародыша (где вектор Nodal расположен строго дорсально, а BMP — строго вентрально), то исходная ось (синяя стрелка; рис. Б) и вторичная ось (красная стрелка) параллельны. **В, Г.** Если вектор Nodal-BMP перпендикулярен исходной дорсально-вентральной оси, то вторичная эмбриональная ось образуется перпендикулярно первичной оси. **Д, Е.** Если вектор Nodal-BMP совпадает с вектором исходной дорсально-вентральной оси, первичная и вторичная оси закладываются в противоположных направлениях. щ — зародышевый щиток; i — первичный эмбрион; ii — индуцированный вторичный эмбрион. Рис. А, В и Д — стадия щитка, вид с анимального полюса; рис. Б, Г и Е — 30 ч после оплодотворения (вид сбоку)



С разрешения: S. Schneider

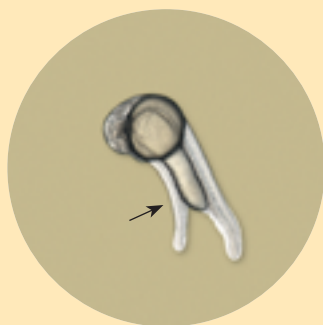
Рис. 11.37. β -Катенин активирует гены организатора *Danio*. На дорсальной стороне бластулы *Xenopus* (увеличенное изображение) отмечается ядерная локализация β -катенина, что способствует формированию центра Ньюкупа под будущим организатором. У поздней бластулы *Danio* (уменьшенное изображение) β -катенин можно наблюдать в ядрах синцитиального желточного слоя под будущим зародышевым щитком

в случае рыб — Wnt8a (Lu et al., 2011). Присутствие β -катенина отличает дорсальную область ЖСС от латеральной и вентральной (**рис. 11.37**; Schneider et al., 1996), а экспериментальная индукция накопления β -катенина на вентральной стороне яйцеклетки приводит к ее дорсализации и образованию второй эмбриональной оси (Kelly et al., 1995).

Формирование лево-правой оси

У всех исследованных позвоночных есть различия в анатомии и развитии правой и левой сторон. У рыб сердце находится слева, в левой и правой частях мозга структуры различаются. Более того, как и у других позвоночных, клетки на левой стороне тела получают информацию о своем расположении посредством передачи сигналов Nodal и фактора транскрипции Pitx2. Способы, которыми разные классы позвоночных создают эту асимметрию, различаются, но, по последним данным, во всех классах позвоночных за формирование лево-правой оси могут отвечать токи, порождаемые подвижными ресничками в узелке (Okada et al., 2005).

У *Danio* образование, в котором расположены реснички, контролирующие лево-правую асимметрию, представляет собой заполненный жидкостью временный орган под названием **пузырек Купфера**. Пузырек Купфера образуется из группы дорсальных клеток возле зародышевого щитка вскоре после гаструляции (см. рис. 11.27). В исследовательской группе Эсснера (2002, 2005) обнаружили, что если ввести микроскопические шарики в пузырек Купфера, то можно увидеть их перемещение от одной стороны пузырька к другой. Блокирование цилиарной функции, предотвращение синтеза динеина или удаление предшественников ресничных клеток приводило к аномалиям образования лево-правой оси. Реснички ответственны за специфическую активацию сигнального каскада Nodal на левой стороне тела. Гены-мишени Nodal критически важны для координации асимметричной миграции органов и морфогенеза в организме зародыша (Rebagliati et al., 1998; Long et al., 2003).



С разрешения: Christine Thisse

О фотографии в начале главы

На фото представлен эмбрион рыбки *Danio*, имеющий две оси тела. Образование вторичной оси (обозначена *стрелкой*) было вызвано пересадкой участка другого зародыша, содержащего большое количество Nodal (см. рис. 11.36). Выдвигаются новые гипотезы о природе сращенных близнецов, позволяющие предполагать, что эктопическая экспрессия сигнальных молекул, таких как Nodal, во время гаструляции может привести к образованию новой оси. Человеческих сиамских близнецов мы будем обсуждать более подробно в гл. 12.

11

Коротко Амфибии и рыбы

1. Дробление амфибий голобластическое, однако оно так же неравномерно из-за присутствия желтка в вегетативном полушарии.
2. Гаструляция амфибий начинается с эпиболии эктодермы, за которой следует инвагинация

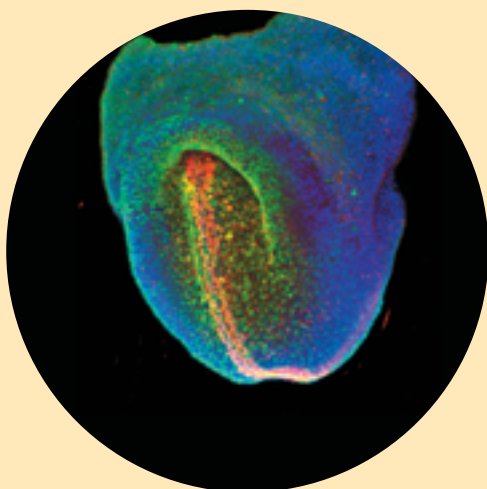
- бутылковидных клеток и скоординированная инволюция мезодермы. Вегетативная ротация играет значительную роль в контроле процесса инволюции.
3. Движущими силами эктодермальной эпиболии и сопутствующего расширения мезодермы является

- интеркаляция, при которой происходит слияние нескольких слоев ткани. Фибронектин играет важную роль в обеспечении возможности мезодермальных клеток мигрировать внутрь зародыша.
4. Дорсальная губа бластопора формирует ткань-организатор гастрюлы амфибии. Ткань дорсализирует эктодерму, превращая ее в нервную ткань, а вентральную мезодерму — в латеральную и дорсальную мезодерму.
 5. Организатор состоит из глоточной энтодермы, мезодермы головы, хорды и тканей дорсальной губы бластопора. Функция организатора осуществляется путем секреции белков (Noggin, хордин и фоллистатин), блокирующих сигнал BMP, который мог бы вентрализовать мезодерму и активировать эпидермальные гены в эктодерме.
 6. Дорсовентральная спецификация начинается с материнских факторов и белков, хранящихся в вегетативной цитоплазме. Они включают Nodal-подобные паракринные факторы, факторы транскрипции (такие как VegT) и агенты, защищающие β -катенин от деградации.
 7. Организатор индуцируется центром Ньюкупа, расположенным в самых дорсальных вегетативных клетках. Центр образуется путем перемещения белков Disheveled и Wnt11 на дорсальную сторону яйца для стабилизации β -катенина в дорсальных клетках зародыша.
 8. Центр Ньюкупа формируется путем накопления β -катенина, который в сочетании с Tcf3 образует комплекс факторов транскрипции, способный активировать транскрипцию генов *siamois* и *twin* на дорсальной стороне эмбриона.
 9. Белки Siamois и Twin совместно с транскрипционным фактором Smad2, активированным TGF β -сигналингом (Nodal, Vg1), активируют гены, кодирующие ингибиторы BMP. Ингибиторы включают секретируемые факторы Noggin, хордин и фоллистатин, а также транскрипционный фактор Goosecoid.
 10. В присутствии ингибиторов BMP эктодермальные клетки образуют нервную ткань. В результате действия BMP эктодерма становится эпидермисом.
 11. В головной области дополнительный набор белков (Cerberus, Frzb, Dickkopf, Tiki) блокирует сигнал Wnt от вентральной и латеральной мезодермы.
 12. Передача сигналов Wnt вызывает формирование градиента β -катенина вдоль антерио-постериорной оси нервной пластинки; по-видимому, этот градиент специфицирует отделы нервной трубки.
 13. Инсулиноподобные факторы роста (IGF) помогают трансформировать нервную трубку в антериорную ткань (передний мозг).
 14. По-видимому, образование лево-правой оси инициирует активация белка Nodal исключительно на левой стороне эмбриона. У шпорцевой лягушки, как и у других позвоночных, белок Nodal активирует экспрессию *pitx2*, что имеет решающее значение для появления отличий левой стороны тела от правой.
 15. Дробление у рыб является меробластическим. Глубинные клетки бластодермы образуются между желточным синцитиальным слоем и кроющим слоем. Эти клетки мигрируют поверх желтка, образуя гипобласт и эпибласт.
 16. На будущей дорсальной стороне гипобласт и эпибласт интеркалируют с образованием зародышевого щитка — структуры, гомологичной организатору земноводных. Трансплантация зародышевого щитка на вентральную сторону другого эмбриона вызывает формирование второй оси тела.
 17. Как у амфибий, так и у рыб нейроэктодерма может образовываться там, где заблокирована BMP-опосредованная индукция эпидермальной ткани. Зародышевый щиток рыб, как и дорсальная губа бластопора амфибий, секретирует антагонисты BMP. Подобно организатору земноводных, функция щитка рыб обусловлена индукцией β -катенином и подлежащими энтодермальными клетками, экспрессирующими Nodal-родственные паракринные факторы.

Птицы и млекопитающие

12

Можете ли вы разглядеть голову
и хвост? Как эмбрион млекопитающих
определяет положение каждой части?



С разрешения: I. Costello и E. Robertson

Эта заключительная глава, посвященная процессам раннего развития, расширяет наше описание особенностей развития амниот — позвоночных животных, эмбрионы которых окружены амнионом, т. е. защитной оболочкой, заполненной жидкостью (рептилий, птиц и млекопитающих). Птицы и рептилии обладают очень схожими чертами развития (Gilland and Burke 2004; Coolen et al., 2008), современные специалисты в области таксономии рассматривают птиц как кладу рептилий (**рис. 12.1А**).

Развивающаяся яйцеклетка **амниот** окружена несколькими оболочками, обеспечивающими выживание эмбриона в условиях суши (**рис. 12.1Б**). В первую очередь это **амнион**, в честь которого группа и получила название. Он образуется на ранней стадии эмбрионального развития и служит для создания жидкой среды вокруг развивающегося зародыша, предохраняя его от высыхания. Важную роль в получении зародышем питательных веществ и развитии кровеносной системы играет еще одна оболочка — **желточный мешок**. **Аллантаис**, развивающийся на заднем конце зародыша, служит хранилищем продуктов жизнедеятельности. А хорион выполняет функцию газообмена, так как содержит кровеносные сосуды. У птиц и большинства рептилий, а также яйцекладущих млекопитающих (однопроходных) эмбрион, окруженный внезародышевыми оболочками, покрыт дополнительной твердой или кожистой оболочкой (скорлупой), внутри которой происходит развитие вне тела матери. Дробление у птиц и рептилий, так же как и у костистых рыб, развитие которых было описано в предыдущей главе, меробластическое, при котором лишь небольшая часть объема яйцеклетки служит для образования клеток зародыша. Большая часть объема крупной яйцеклетки заполнена желтком, обеспечивающим питание растущего эмбриона.

У большинства млекопитающих дробление голобластическое (полное), однако имеет модификации, связанные с образованием **плаценты** — органа, состоящего из тканей и кровеносных сосудов как матери, так и плода. Газообмен, поглощение питательных веществ и выведение продуктов обмена реализуются при помощи плаценты, благодаря этому органу эмбрион может развиваться внутри другого организма.

С тех пор как Аристотель впервые наблюдал и детально описал развитие домашней курицы (*Gallus*

gallus), занимающее около 3 недель, данный организм стал излюбленным объектом для проведения эмбриологических исследований. Он доступен в течение всего года и с ним легко работать. Кроме того, при поддержании определенной температуры во время инкубации сроки наступления стадий развития можно четко предсказать, таким образом можно получить большое количество эмбрионов, находящихся на одной стадии. В регуляции процессов формирования органов цыпленка принимает

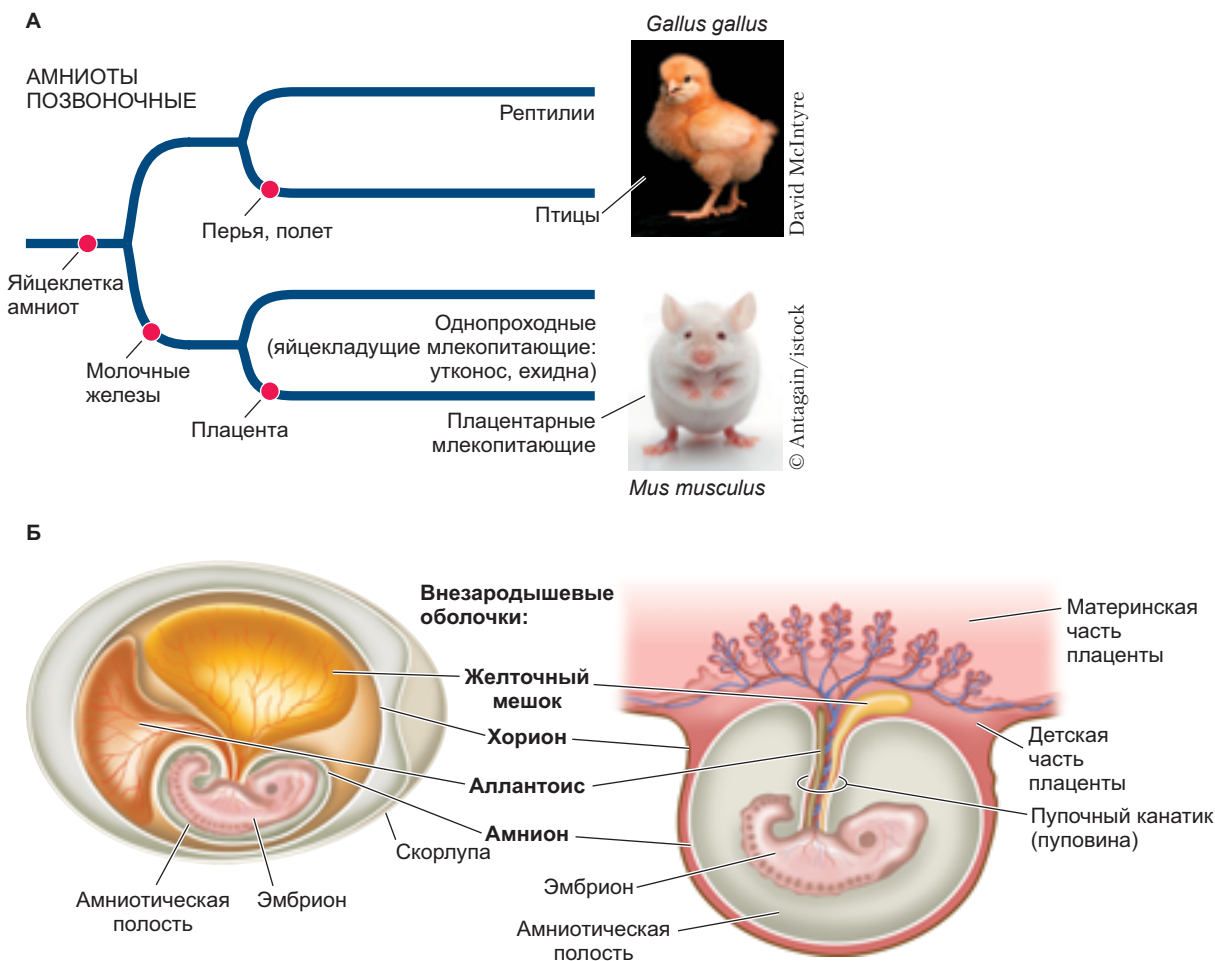


Рис. 12.1. Оболочки яйца амниот (рептилий, птиц и млекопитающих). **А.** Филогенетическое древо амниот. Обратите внимание, что большинство современных специалистов по таксономии рассматривают птиц как рептилий, однако для физиологических исследований эти таксоны разделяют. (Другие летающие и пернатые рептилии не сохранились до нашего времени.) Одним из наиболее широко изучаемых видов птиц является домашняя курица (*Gallus gallus*). Среди млекопитающих лучше всего изучено развитие лабораторной мыши (*Mus musculus*). Изучение как птиц, так и мышей способствует лучшему пониманию закономерностей развития человека. **Б.** Скорлупа, покрывающая яйцеклетку амниот (куриное яйцо, *слева*), позволяет животным развиваться вне тела матери или водной среды. Амнион обеспечивает создание водной среды, в которой происходит развитие эмбриона, в аллантоисе хранятся продукты обмена, а кровеносные сосуды в составе хориона позволяют осуществлять газообмен и получать питательные вещества из желточного мешка. У млекопитающих (*справа*) эти процессы организованы по-другому: кровеносные сосуды участвуют в газообмене и получении питательных веществ через плаценту, располагающуюся в матке матери, а не через желточный мешок

участие большое число молекул. Кроме того, типы клеточных движений, имеющих место в развитии птиц, похожи на движения при формировании органов млекопитающих. Курица — один из немногих организмов, чьи эмбрионы легко могут быть подвергнуты как хирургическим, так и генетическим манипуляциям (Stern, 2005a). Таким образом, эмбрион курицы часто служит моделью эмбриона человека, как и вездесущая лабораторная мышь.

Мышь — модельный организм, наиболее часто используемый в различных исследованиях, включающих генетические и хирургические манипуляции. Она была первым представителем млекопитающих, геном которого секвенировали. После того как расшифрованная последовательность была опубликована, многие исследователи заявили, что эта информация более ценная, чем расшифровка последовательности генома человека. Их аргументация заключалась в том, что, работая с модельным организмом — мышью, можно манипулировать с каждым и со всеми генами для определения их функций (Gunter and Dhand, 2002). Подобные манипуляции невозможно производить с человеком. Развитие человека является предметом как медицинского, так и общенаучного интереса, и последние разделы данной главы будут посвящены раннему развитию нашего организма, покажут универсальность многих принципов, описанных для модельных систем.

Раннее развитие птиц

Оплодотворение яйцеклетки курицы происходит в яйцевом, до того как альбумин (яичный белок) и скорлупа будут секретированы и покроют ее. Дробление длится на протяжении первых суток развития, пока яйцо находится еще внутри курицы. За это время зародыш проходит путь от зиготы до поздней бластулы (Sheng, 2014). Как и яйцеклетка *Danio rerio*, яйцеклетка курицы является телолецитальной с небольшим диском цитоплазмы, свободной от желтка, — **бластодиском**, располагающимся на поверхности массивной цитоплазмы желтка (рис. 12.2А).

Дробление у птиц

Как и яйцеклетки рыб, богатые желтком яйцеклетки птиц претерпевают **дискоидальное меробластическое дробление**. Дробится только бластодиск, располагающийся на анимальном полюсе яйцеклетки и достигающий 2–3 мм в диаметре. Первая борозда деления дробления образуется в центре бластодиска, в результате последующих делений формируется **бластодерма** (рис. 12.2Б, В).

Как и у рыб, дробление у птиц не захватывает заполненную желтком цитоплазму, поэтому клетки

на ранних этапах дробления связаны друг с другом и с желтком. После того как направление борозд меняется и они начинают проходить экваториально и вертикально, бластодерма превращается в ткань, толщиной в четыре слоя клеток, причем клетки связаны друг с другом плотными контактами (рис. 12.2Б; Bellairs et al., 1978; Eyal-Giladi 1991; Nagai et al., 2015). Включение собственного (зиготического) генома зародыша происходит после восьмого или девятого деления дробления, когда в эмбрионе насчитывается около 128 клеток (Nagai et al., 2015).

Между бластодермой и желтком в яйцеклетке птиц образуется **полость**, которую называют **подзародышевой**. Она формируется, когда клетки бластодермы поглощают воду из альбумина и выделяют жидкость в пространство между собой и желтком (New, 1956). На этой стадии глубокие клетки в центре бластодермы, по-видимому, погибают, оставляя тонкий слой толщиной всего лишь в одну клетку, который носит название **area pellucida**. Эта часть бластодермы будет давать начало практически всем клеткам эмбриона. Кольцо клеток бластодермы, в котором гибель глубоких клеток не происходила, располагается на периферии и составляет **area opaca**. Между **area pellucida** и **area opaca** находится тонкий слой клеток, называемый **краевой (маргинальной) зоной** (Eyal-Giladi, 1997; Arendt and Nübler-Jung, 1999). Часть клеток краевой зоны будет играть важную роль при определении траектории развития других клеток на ранних этапах развития цыпленка.

Гастрюляция у птиц

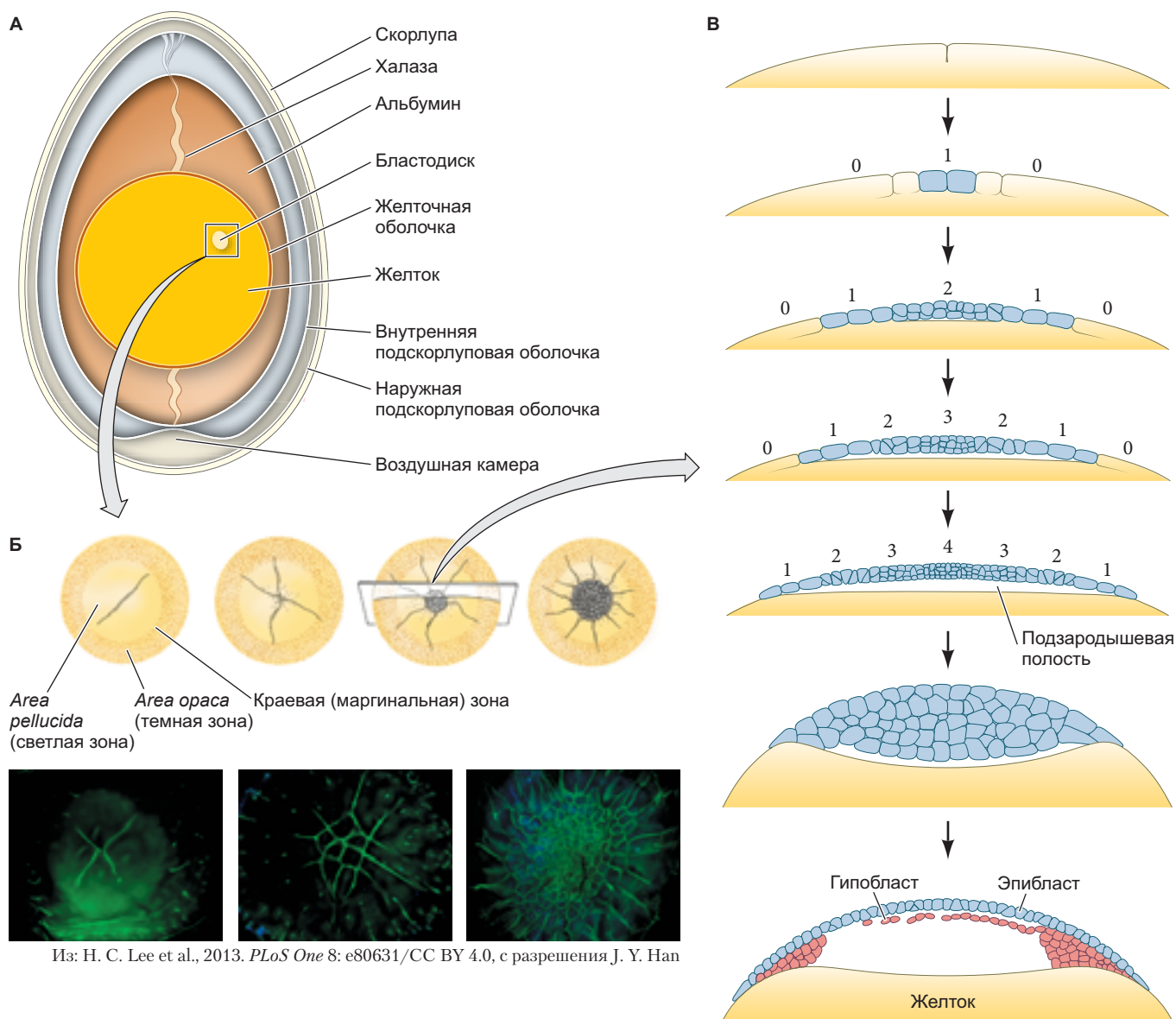
Бластодерма разделяется на два слоя, верхний слой носит название эпибласт, а нижний — гипобласт (см. рис. 12.2Б). Ткани эмбриона птиц будут полностью сформированы из эпибласта, гипобласт же не вносит вклад в формирование тканей зародыша (Rosenquist, 1966; 1972). Вместо этого клетки гипобласта принимают участие в образовании внезародышевых оболочек (см. рис. 12.1Б), в первую очередь желточного мешка и желточного стебелька, связывающего массу желтка с кишкой, имеющей энтодермальное происхождение. Клетки гипобласта вырабатывают химические вещества, направляющие миграцию клеток эпибласта. Тем не менее все три зародышевых листка, а также внезародышевые оболочки — амнион, хорион и аллантоис, формируются исключительно из эпибласта (Schoenwolf, 1991).

ГИПОБЛАСТ

К тому моменту, когда курица откладывает яйцо, в бластодерме можно насчитать до 50 000 клеток. В это время большая часть клеток **area pellucida** остается на поверхности и формирует **эпибласт**. Вско-

ре после того как яйцо покидает организм матери, на заднем крае *area pellucida* формируется небольшое утолщение эпибласта, называемое **серпом Коллера**. Между *area opaca* и серпом Коллера находится **задняя краевая зона** (задняя маргинальная зона, PMZ). Слой клеток, располагающийся на задней

границе между *area pellucida* и краевой зоной, мигрирует в переднем направлении под поверхностью других клеток. Тем временем клетки, расположенные в передней области эпибласта, претерпевают деламинацию (разделение на два слоя), но остаются связанными с эпибластом, образуя «островки» ги-



Из: H. C. Lee et al., 2013. *PLoS One* 8: e80631/CC BY 4.0, с разрешения J. Y. Han

Рис. 12.2. Дискоидальное меробластическое дробление яйцеклетки курицы. **А.** Яйцеклетки птиц — одни из самых больших известных клеток (достигают нескольких сантиметров в диаметре), но дробится лишь небольшая область. Большая часть цитоплазмы заполнена желтком за исключением небольшого участка — бластодиска, который и будет дробиться. Белковый тяж халаза удерживает яйцеклетку в центральном положении внутри скорлупы. Яичный белок альбумин начинает окружать яйцеклетку по мере продвижения по яйцеводу. **Б.** Ранние стадии дробления, вид с анимального полюса (будущей дорсальной (спинной) стороны зародыша). На микрофотографиях показаны мембраны плотно наложенных друг на друга клеток, окрашенные фаллоидином (зеленым). **В.** Схематичное изображение поведения клеток в течение первых суток после оплодотворения, когда зигота находится еще в организме курицы. Цифры относятся к слоям клеток. (Рис. Б по данным: R. Bellairs et al., 1978. *J Embryol Exp Morphol* 43: 55–69; рис. В по данным: Nagai et al. 2015. *Development* 142: 1279–1286.)

побласта — скопления из 5–20 клеток, которые при последующих миграциях сформируют **первичный гипобласт** (рис. 12.3А, Б). Слой клеток, выселяющийся из серпа Коллера, объединяется с первичным гипобластом с образованием завершённого слоя гипобласта, называемого также **вторичным гипобластом** или **эндобластом** (рис. 12.3В–Д; Eyal-Giladi et al., 1992; Bertocchini and Stern, 2002; Khaner, 2007a, b). В результате два слоя бластодермы (эпибласт и гипобласт) оказываются соединёнными в области краевой зоны, а пространство между ними — полость, похожая на бластоцель. Таким образом, хотя форма и способ образования бластодиска птиц отличается от бластулы амфибий, рыб или иглокожих, общие пространственные взаимодействия (закономерности) сохраняются.

ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРВИЧНОЙ ПОЛОСКИ

Хотя у многих групп рептилий гастрюляция может начинаться с миграции клеток через бластопор, подобный бластопору амфибий, гастрюляция птиц и млекопитающих происходит путем выселения клеток через **первичную полосу**, которую можно рассматривать как эквивалент удлинённой губы бластопора амфибий (Alev et al., 2013; Bertocchini et al., 2013; Stower et al., 2015). Цейтраферная съёмка зародышей, клетки которых были помечены витальными красителями, показывает, что первичная полоска возникает в первую очередь в области серпа Коллера и эпибласта, располагающегося над серпом (Bachvarova et al., 1998; Lawson and Schoenwolf, 2001a, b; Voiculescu et al., 2007). Клетки сходятся, образуя первичную полосу, посередине полосы формируется углубление, называемое **первичной бороздкой**. Большинство мигрирующих клеток проходит через первичную бороздку, которая служит воротами в глубокие слои зародыша (рис. 12.4; Voiculescu et al., 2014). Таким образом, первичная бороздка гомологична бластопору амфибий, а первичная полоска гомологична губе бластопора.

На переднем конце первичной полосы формируется утолщение, называемое Гензеновским узелком (известным также как первичный узелок; рис. 12.4В). В центре Гензеновского узелка находится углубление в форме воронки (иногда называемое первичной ямкой), через которое клетки могут проникать вглубь, образуя хорду и прехордальную пластинку. Гензеновский узелок является функциональным эквивалентом дорсальной губы бластопора амфибий (т. е. организатора) и зародышевого щитка рыб (Boettger et al., 2001).

Первичная полоска участвует в определении основных осей тела зародыша птицы. Она простирается от заднего (постериорного) к переднему (антериорному) концу, клетки выселяются с дорсальной стороны и перемещаются на вентральную; кроме

того, первичная полоска отделяет левую половину эмбриона от правой. Ось полосы соответствует дорсально-вентральной оси амфибий. Передний конец первичной полосы — Гензеновский узелок даёт начало прехордальной мезодерме, хорде и средней (медиальной) части сомитов. Клетки, выселяющиеся через среднюю часть полосы, дают начало боковой (латеральной) части сомитов, сердцу и почкам. Клетки, выселяющиеся через задний конец полосы, участвуют в образовании боковой (латеральной) пластинки и внезародышевой мезодермы (Psychoyos and Stern, 1996). После ингрессии (выселения) клеток мезодермы клетки эпибласта, оставшиеся близко к полоске, но на поверхности, будут формировать медиальные (дорсальные) структуры, например нервную пластинку, в то время как клетки эпибласта, располагающиеся дальше от полосы, дадут начало эпидермису (см. рис. 12.4, *правая панель*).

УДЛИНЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ ПОЛОСКИ

По мере того как клетки входят в первичную полосу, они претерпевают эпителио-мезенхимный переход, а также происходит разрушение подстилающей эти клетки базальной пластинки. Полоска удлиняется в направлении будущего головного конца зародыша за счёт активной миграции клеток в центральную область зародыша. Конвергентное растяжение обеспечивает удлинение первичной полосы: увеличение длины полосы вдвое сопровождается таким же уменьшением её ширины (см. рис. 12.4Б; Voiculescu et al., 2007). Пролиферация клеток в составе первичной полосы способствует удлинению полосы совместно с конвергентным растяжением. Некоторые клетки передней части эпибласта участвуют в образовании Гензеновского узелка (Streit et al., 2000; Lawson and Schoenwolf, 2001b).

В то же время клетки вторичного гипобласта (эндобласта) продолжают мигрировать в переднем направлении из области задней краевой (маргинальной) зоны бластодермы (см. рис. 12.3Д). Удлинение первичной полосы, по-видимому, сопряжено с миграцией клеток вторичного гипобласта, направляющих движение клеток первичной полосы (Waddington, 1933; Foley et al., 2000; Voiculescu et al., 2007, 2014). Первичная полоска в итоге по длине занимает 60–75% *area pellucida*.

ОБРАЗОВАНИЕ ЭНТОДЕРМЫ И МЕЗОДЕРМЫ

Основное правило определения проспективной судьбы клеток у амниот заключается в том, что разметка области презумптивных зародышевых листков (эктодермы, мезодермы или энтодермы) происходит до начала гастрюляции (Chapman et al., 2007), но дифференцировка клеток находится под

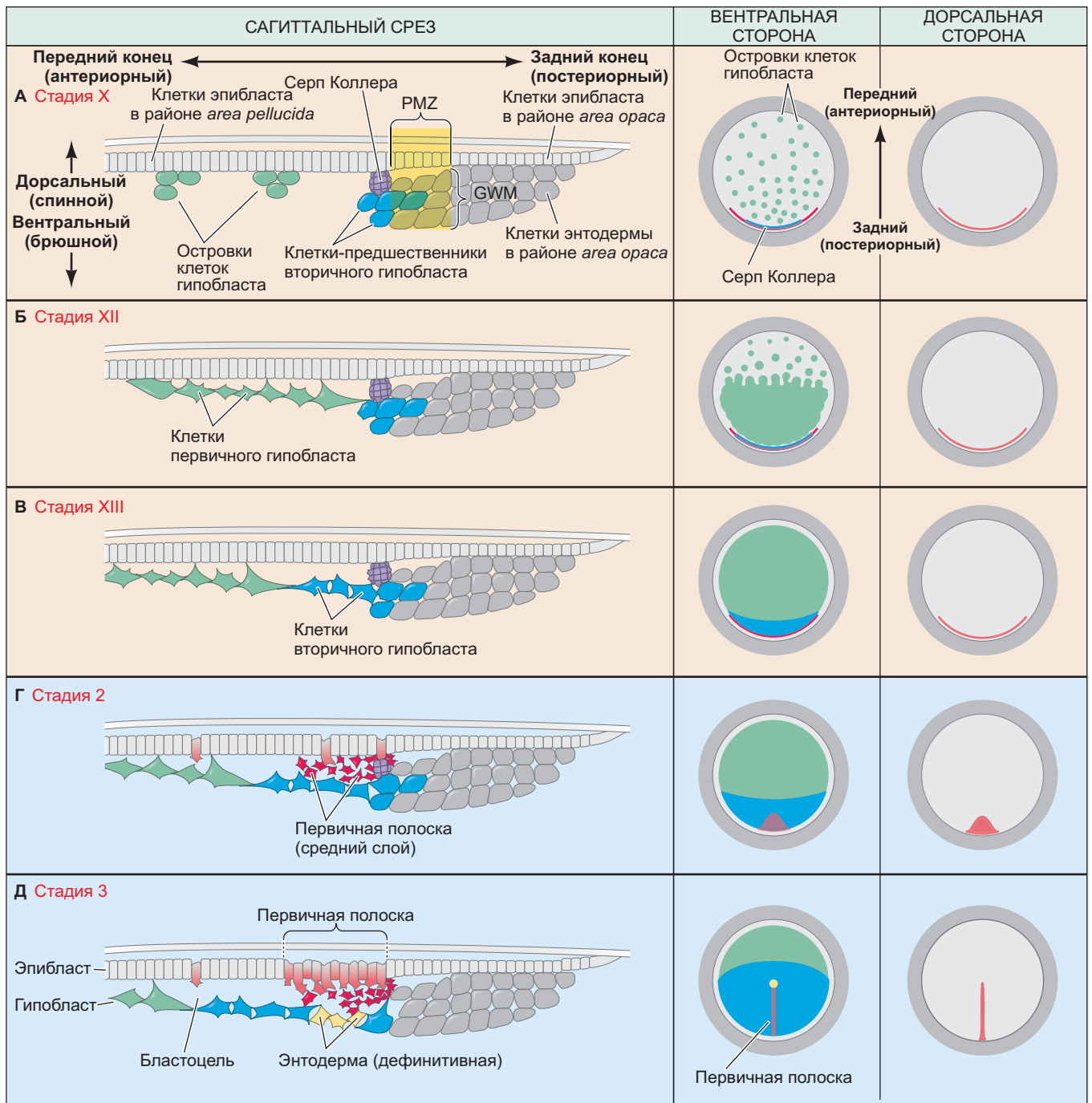
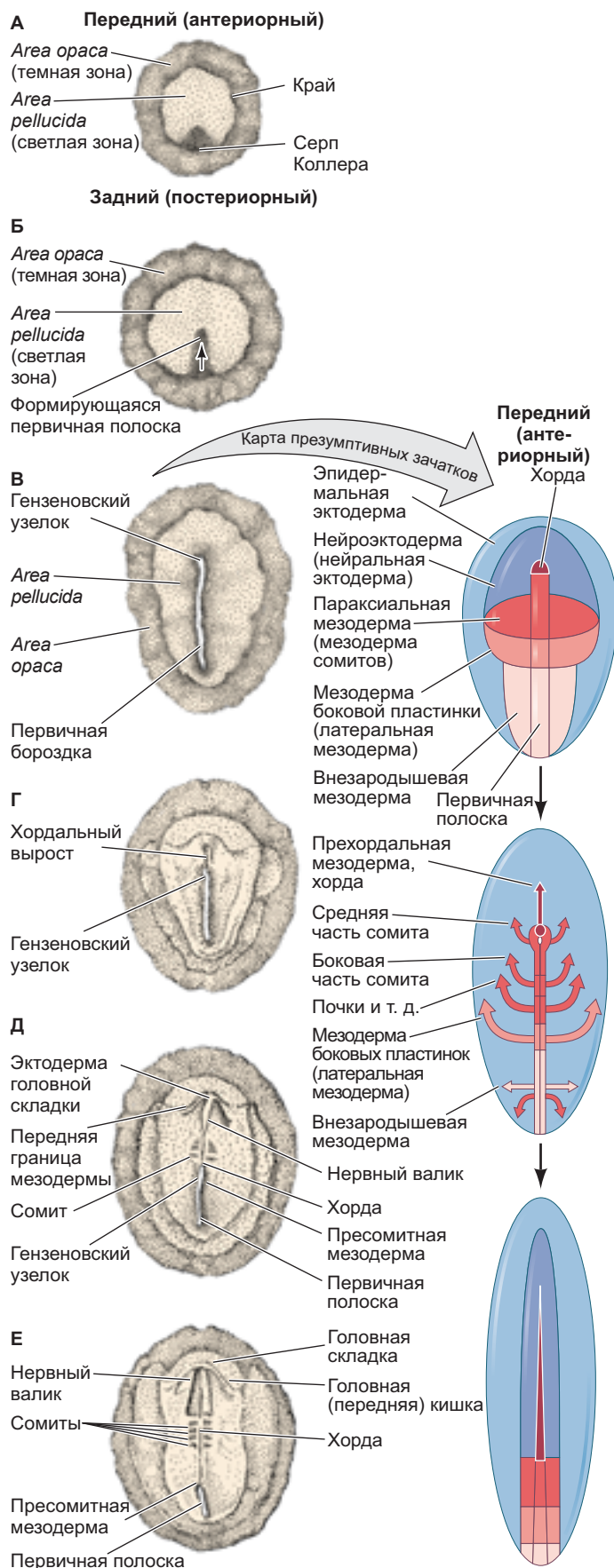


Рис. 12.3. Образование бластодермы птиц. Левый столбец — схематичное изображение сагиттального среза бластодермы. Средний столбец — целый эмбрион, вид с вентральной стороны. Показана миграция клеток первичного и вторичного (эндобласта) гипобласта. Правый столбец — целый эмбрион, вид с дорсальной стороны. **А–В.** События до формирования первичной полоски. **А.** Эмбрион на стадии X. Видны островки клеток гипобласта и скопление клеток гипобласта около серпа Коллера. Задняя краевая (маргинальная) зона (PMZ) эпибласта и глубокие клетки, содержащие большое количество желтка, подстилающие краевую зону (GWM). **Б.** На стадии XII слой клеток, выселяющихся вперед от серпа Коллера, объединяется с островками клеток гипобласта, образуя полный слой гипобласта. **В.** На стадии XIII, непосредственно перед формированием первичной полоски, завершается образование гипобласта. **Г.** На стадии 2 (через 12–14 ч отложения яйца) клетки первичной полоски образуют третий слой, который располагается между эпибластом и гипобластом. **Д.** На стадии 3 (через 15–17 ч после отложения яйца) первичная полоска стала частью эпибласта, через нее выселяются клетки, дающие начало мезодерме и энтодерме. (По данным: С. D. Stern, 2004. Из: *Gastrulation: From Cells to Embryo*, С. D. Stern [Ed.] pp. 219–232. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.)



контролем индукционных взаимодействий во время или после миграции клеток через первичную полосу. Как только первичная полоска сформирована, клетки эпибласта начинают выселяться через нее в пространство между эпибластом и гипобластом (напоминающее бластоцель амфибий). Таким образом, в первичной полоске происходит постоянная смена клеточного состава. Клетки, мигрирующие через передний конец полосы, проходят вниз и вперед, образуя энтодерму, мезодерму головы и хорду. Клетки, выселяющиеся через более постериорные участки первичной полосы, дают начало большей части мезодермальных тканей (рис. 12.5; Rosenquist, 1966; Schoenwolf et al., 1992).

Первые клетки, мигрирующие через Гензенoвский узeлок, будут участвовать в формировании энтодермы глотки, т. е. энтодермы передней кишки. Заселив глубокие слои зародыша, энтодермальные клетки, перемещаясь вперед, в итоге вытесняют клетки гипобласта в переднюю часть *area pellucida*. Клетки в этой серповидной области не принимают участия в образовании структур эмбриона, однако здесь располагаются предшественники половых клеток, которые впоследствии с током крови будут переноситься к зачаткам гонад и заселять их.

Клетки, выселяющиеся через Гензенoвский узeлок вслед за энтодермой, тоже движутся в переднем направлении, но не так вентрально, как презумптивные клетки кишечной энтодермы. Они занимают положение между энтодермой и эпибластом, образуя мезодерму **прехордальной пластинки** (Psychoyos and Stern, 1996). Таким образом, головные структуры эмбриона птиц формируются спереди (ростральнее) Гензенoвского узeлка.

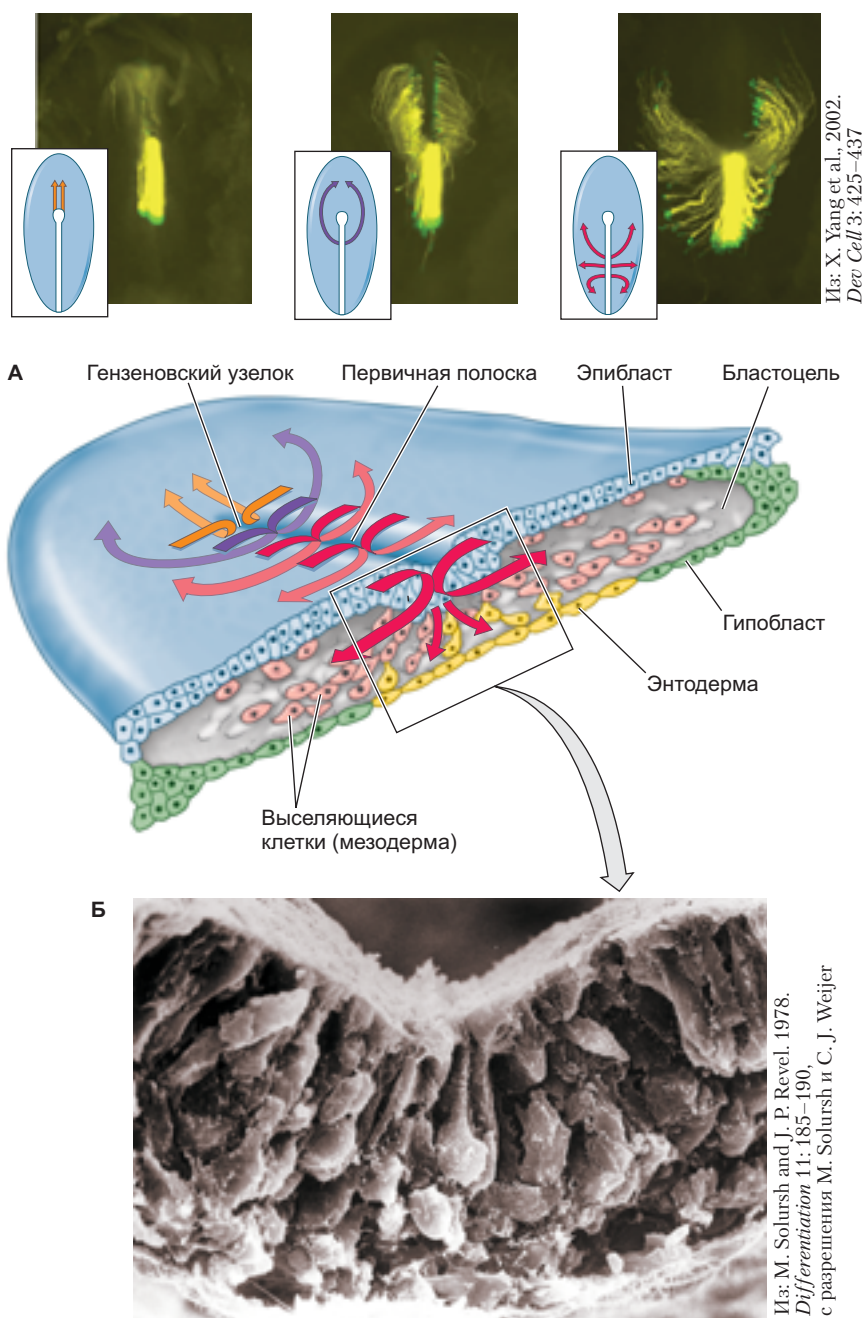
Следующая популяция клеток, мигрирующая через Гензенoвский узeлок, дает начало хордомезодерме. Самая передняя часть **хордального выроста**

Рис. 12.4. Движение клеток первичной полосы и карта презумптивных зачатков эмбриона цыпленка. А–В. Вид с дорсальной (спинной) стороны на формирующуюся и удлиняющуюся первичную полосу. Бластодерма показана на стадии (А) 12–14 ч, (Б) 15–17 ч и (В) 18–20 ч после отложения яйца. Г–Е. Образование хорды и сомитов по мере того как первичная полоска укорачивается; процесс показан на стадии (Г) 20–22 ч, (Д) 23–25 ч и (Е) стадия четырех пар сомитов. Карта презумптивных зачатков зародыша курицы показана для двух стадий: стадии полностью сформированной первичной полосы (В) и стадии нейрулы (Е). На стадии (Е) энтодерма мигрировала (произошла ингрессия) под эпибласт, а вдоль средней линии хорошо заметно конвергентное растяжение. Движение клеток-предшественниц мезодермы через первичную полосу показано на рисунке (В). (По данным: В. М. Patten, 1951. *Early Embryology of the Chick*, 4th ed., pp. 70–85: The Blakiston Company: Philadelphia; J. L. Smith and G. C. Schoenwolf, 1998. *Curr Top Dev Biol* 40: 79–110.)

образована клетками, выселившимися в переднем направлении вслед за мезодермой прехордальной пластинки (см. рис. 12.4 и 12.5). Хордальный вырост подстилает клетки, которые будут принимать участие в формировании переднего и среднего мозговых пузырей. По мере того как первичная полоска подвергается регрессии, клетки, располагающиеся в области смещающего к заднему концу тела Гензен-овского узелка, дадут начало хорде. Когда первич-

ная полоска полностью сформирована, те клетки эктодермы, которые располагаются рядом с Гензен-овским узелком, будут образовывать часть нервной трубки от переднего мозга до слухового пузырька. Небольшая часть нейроэктодермы, лежащая латеральнее и постериорнее Гензен-овского узелка (иногда ее называют каудальным латеральным эпибластом), будет формировать оставшиеся отделы нервной системы, включая задний отдел головного мозга и весь

Рис. 12.5. Миграция клеток эктодермы и мезодермы через первичную полоску. **А.** Объемная модель эмбриона курицы на стадии гастрюлы показывает взаимосвязь первичной полоски, мигрирующих клеток, гипобласта и эпибласта бластодермы. Нижний слой становится мозаикой из клеток гипобласта и энтодермы. В итоге происходит их разделение, клетки гипобласта располагаются на периферии и участвуют в образовании желточного мешка. Над каждой областью модели эмбриона представлены микрофотографии, показывающие соответствующее положение клеток, меченных GFP, в составе первичной полоски. Клетки, выселяющиеся через Гензен-овский узелок, движутся вперед и образуют прехордальную пластинку и хорду. Клетки, подворачивающиеся через переднюю часть первичной полоски, расположенную за Гензен-овским узелком, мигрируют в поперечном направлении, но затем сходятся вдоль средней линии с образованием хорды и сомитов. Клетки, выселяющиеся через среднюю часть первичной полоски, участвуют в формировании промежуточной мезодермы и мезодермы боковых пластинок (латеральной мезодермы) (см. карту презумптивных зачатков на рис. 12.4). Клетки, подворачивающиеся через заднюю часть первичной полоски, образуют внезародышевую мезодерму (не показана). **Б.** На микрофотографии, полученной с помощью сканирующего электронного микроскопа, показаны клетки эпибласта, уходящие внутрь бластоцеля, изменяющие свою морфологию (апикальный конец расширяется) и превращающиеся в бутылковидные. (Рис. А по данным: В. I. Balinsky. 1975. *Introduction to Embryology*, 4th Ed. Saunders: Philadelphia.)



спинной мозг. По мере регрессии первичной полоски происходит смещение Гензеновского узелка и в каудальном направлении (к заднему концу тела), при этом продолжается удлинение нервной пластинки. По-видимому, сигнальный каскад FGF в первичной полоске и осевой мезодерме (будущие сомиты) поддерживает клетки в этой области в недифференцированном состоянии в период ее регрессии; как только клетки покидают эту область, происходит активация сигнального каскада ретиноевой кислоты, являющегося антагонистом FGF-каскада (рис. 12.6; см. также гл. 17; Diez del Corral et al., 2003).

РЕГРЕССИЯ ПЕРВИЧНОЙ ПОЛОСКИ И ЭПИБОЛИЯ ЭКТОДЕРМЫ

Начинается новый этап развития организма. По мере того как ингрессия (подворачивание) мезодермы продолжается, происходит регрессия первичной полоски, сопровождающаяся смещением Гензеновского узелка из центра *area pellucida* в более постериорную область (рис. 12.7). На месте первичной полоски образуется осевая дорсальная ось зародыша. Хорда распространяется в направлении от головы к хвосту от того уровня, где будут сформированы задний мозг и уши, и до самых каудальных отделов зародыша. Как и у лягушки, энтодерма глотки и мезодерма головы у птиц будут в значительной степени индуцировать дифференцировку передних отделов головного мозга, тогда как хорда будет направлять дифференцировку заднего и спинного мозга. К этому времени все клетки презумптивной энто- и мезодермы уже заняли свое место в эмбрионе, а эпибласт полностью состоит из клеток презумптивной эктодермы.

В то время как клетки презумптивной мезо- и энтодермы движутся внутрь, предшественники эктодермы пролиферируют и мигрируют, обрастая желток, — происходит эпиболия. Обрастание желтка эктодермой, напоминающее эпиболию у амфибий, — геркулесов труд и занимает четыре дня. В это время происходит постоянное увеличение количества клеток, а также миграция клеток презумптивной эктодермы по внутренней поверхности желточной оболочки (New, 1959; Spratt, 1963). Необходимо отметить, что только клетки наружного края *area opaca* прикреплены к желточной оболочке. По своей природе они отличаются от остальных клеток бластодермы и способны формировать огромные (500 мкм) цитоплазматические выросты в направлении желточной оболочки. Эти филоподии, предположительно, становятся ведущими при движении клеток краевой зоны, которые, в свою очередь, подтягивают другие клетки эктодермы во время обрастания желтка (Schlesinger, 1958). Филоподии связываются с фибронектином — ламинарным белком, который входит в состав желточной оболочки у птиц. Если

нарушить взаимодействие между клетками и фибронектином путем добавления растворимого полипептида, подобного фибронектину, филоподии вытягиваются и миграция эктодермы прекращается (Lash et al., 1990).

Таким образом, к моменту завершения гаструляции птиц эктодерма окружает эмбрион, энтодерма замещает гипобласт, а мезодерма занимает полагающееся ей место между этими двумя областями.

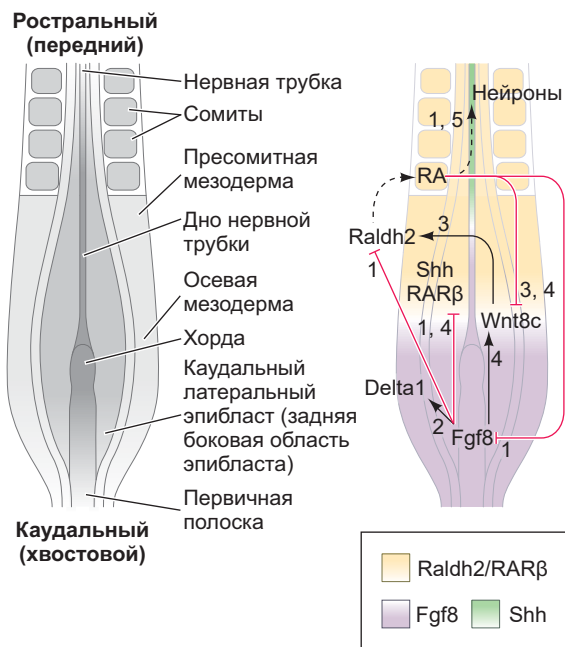


Рис. 12.6. Сигналы, регулирующие формирование осей эмбриона курицы. На 10-й стадии Fgf8 подавляет синтез фермента Raldh2, необходимого для выработки ретиноевой кислоты в клетках пресомитной мезодермы (1), а также рецептора ретиноевой кислоты RARβ в клетках нейтральной эктодермы (4). Подавление приводит к нарушению дифференцировки клеток эпибласта, расположенных каудально и латерально (тех клеток, которые примыкают к границе Гензеновского узелка и первичной полоски, формирующих латеральные и дорсальную части нервной трубки) и каудально преимущественно осевой мезодермы (1, 5), обычно запускаемой ретиноевой кислотой. Кроме того, Fgf8 ингибирует экспрессию *Sonic hedgehog* (Shh) в клетках дна нервной трубки, контролируя тем самым экспрессию генов, кодирующих вентрализирующие факторы (1). Сигнальный каскад FGF необходим также для экспрессии Delta1 в средней области заднего (каудального) латерального эпибласта (2) и активирует экспрессию Wnt8c (4). Поскольку Fgf8 разрушается в области хвостовой осевой мезодермы, сигнальный каскад Wnt обусловлен Wnt8c, вызывающим синтез Raldh2 в смежной осевой мезодерме (4). Ретиноевая кислота, синтезируемая при помощи Raldh2, подавляет Fgf8 (1) и Wnt8c (3, 4). (По данным: V. I. Wilson et al., 2009. *Development* 136: 1591–1604.)

Спецификация осей и роль организатора в эмбрионах птиц

Процессы обособления хорды и головной энтодермы и мезодермы у эмбрионов птиц (и млекопитающих) — яркое подтверждение существования передне-заднего (антерио-постериорного) градиента, характерного для эмбрионов птиц (и млекопитающих). В то время как клетки на задней части эмбриона являются частью первичной полоски и погружаются внутрь, клетки на передней части зародыша

уже начинают формировать органы (Darnell et al., 1999). В течение следующих нескольких дней передняя часть зародыша в своем развитии существенно опережает заднюю.

РОЛЬ ГРАВИТАЦИИ И ЗАДНЯЯ КРАЕВАЯ ЗОНА

Превращение радиально-симметричной бластодермы в двусторонне-симметричную структуру, по-видимому, обусловлено воздействием гравита-

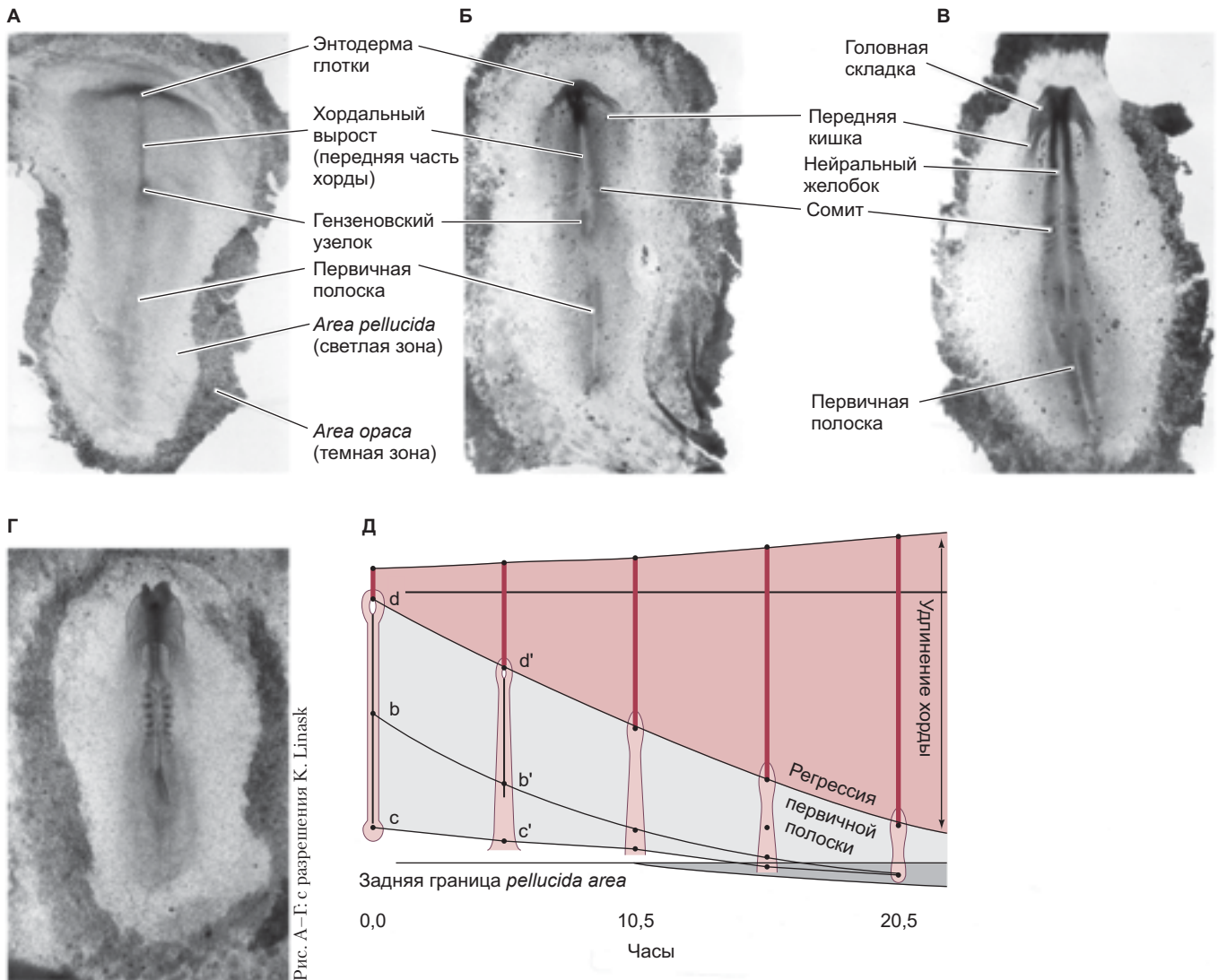


Рис. 12.7. Гастроляция курицы (24–28 ч после оплодотворения). **А.** Полностью сформированная первичная полоска (24 ч). Хордальный вырост (передняя часть хорды) виден спереди от Гензеновского узелка. **Б.** Стадия двух сомитов (25 ч). Энтодерма глотки видна в головном отделе зародыша, хорда удлиняется, а первичная полоска, наоборот, укорачивается. **В.** Стадия четырех сомитов (27 ч). **Г.** Через 28 ч первичная полоска укорачивается еще больше и остается только на заднем конце зародыша. **Д.** Укорачивающаяся первичная полоска оставляет спереди от себя хорду. Различные точки первичной полоски (отмеченные буквами) отслеживали после окончания ее формирования. На оси X (ось времени) отложены часы после достижения максимальной длины первичной полоски (контрольная линия — 18 ч инкубации). (Рис. Д по данным: N. T. Spratt Jr. 1947. *J Exp Zool* 104: 69–100.)

ционного поля. По мере того как яйцеклетка проходит по половым путям курицы, она вращается на протяжении 20 ч. Вращение со скоростью 15 об./ч приводит к смещению компонентов желтка таким образом, что его легкая фракция (вероятно, содержащая запасенные материнские факторы, необходимые для развития) располагается под одним участком бластодермы. В результате один конец бластодермы оказывается выше другого, именно он станет задней краевой (маргинальной) зоной (posterior marginal zone, PMZ), прилегающей к области, где будет сформирована первичная полоска (рис. 12.8; Kochav and Eyal-Giladi, 1971; Bachvarova et al., 1998; Callebaut et al., 2004).

Не известно, какие именно взаимодействия приводят к превращению этой конкретной части бластодермы в PMZ. В начале способностью инициировать формирование первичной полоски обладает вся краевая зона. Если разделить бластодерму на части так, чтобы у каждой части была краевая зона; то в каждой части будет формироваться своя первичная полоска (Spratt and Haas, 1960; Bertocchini and Stern, 2012; Torlopp et al., 2014). Однако после образования PMZ все остальные области краевой зоны попадают под ее контроль. Клетки PMZ не только стимулируют начало гастрюляции, но и препятствуют формированию первичных полосок в других частях краевой зоны (Khaner and Eyal-Giladi, 1989; Eyal-Giladi et al., 1992; Bertocchini et al., 2004).

Формирование лево-правой асимметрии

Тело позвоночных имеет четко различающиеся правую и левую стороны. Например, сердце и селезенка, как правило, располагаются слева, а печень — справа. Различие между сторонами регулирует экспрессия двух белков (паракринного фактора *Nodal* и транс-

крипционного фактора *Pitx2*), только с левой стороны. Однако механизмы активации экспрессии гена *Nodal* на левой стороне тела различаются у разных классов позвоночных. Простота проведения манипуляций с эмбрионами курицы позволила исследователям изучить сигнальные пути, определяющие лево-правую асимметрию у птиц, с большей детализацией, чем у других позвоночных.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕВО-ПРАВОЙ ОСИ У ПТИЦ

По мере того как первичная полоска достигает максимальной длины, транскрипция гена *Sonic hedgehog* (*Shh*) происходит только в левой стороне тела зародыша под контролем активина и его рецептора (рис. 12.9А). Сигнальная система активина совместно с BMP4, по-видимому, препятствует синтезу белка *Sonic hedgehog* и активирует синтез белка *Fgf8* на правой стороне эмбриона. *Fgf8* предотвращает синтез паракринного фактора *Cerberus* на правой стороне и может также активировать сигнальный каскад, что приводит мезодерму к приобретению свойств, характерных только для правой стороны тела (Schlueter and Brand, 2009).

Между тем на левой стороне белок *Shh* активирует *Cerberus* (рис. 12.9Б), который совместно с BMP стимулирует синтез белка *Nodal* (Yu et al., 2008). *Nodal*, в свою очередь, активирует ген *Pitx2* и подавляет *Snail*. Кроме того, *Lefty1*, синтезирующийся на вентральной стороне вдоль средней линии зародыша, препятствует передаче сигнала *Cerberus* на правую сторону тела (рис. 12.9В, Г). Так же как у *Xenopus*, *Pitx2* является ключевым фактором при установлении асимметрии структур

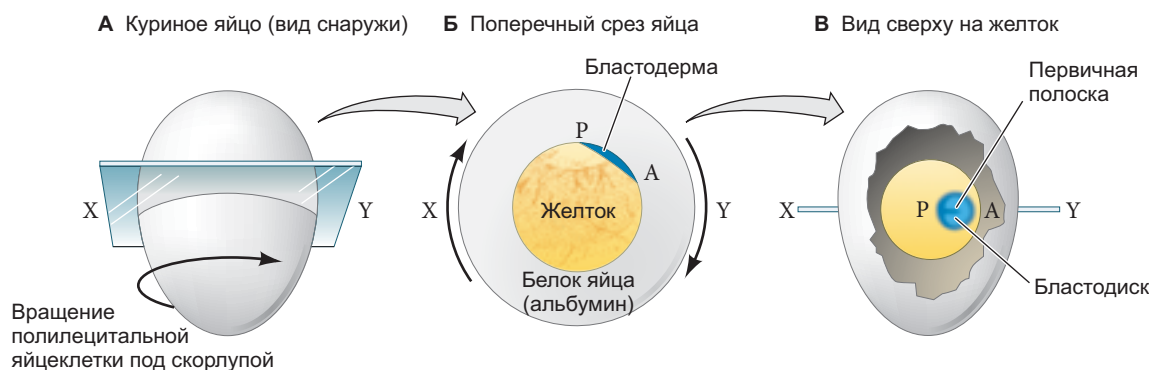


Рис. 12.8. Определение передне-задней оси зародыша курицы под влиянием гравитационного поля. Вращение яйцеклетки внутри скорлупы (А) приводит к приподниманию одного конца бластодермы за счет перераспределения фракций желтка (Б). В. Располагающийся выше участок бластодермы становится задним (постериорным) концом зародыша. (По данным: L. Wolpert et al., 1998. *Principles of Development*. Current Biology Ltd.: London.)

эмбриона. Искусственно вызванная экспрессия Nodal или Pitx2 на правой стороне зародыша курицы приводит к нарушению формирования асимметрии или к случайному распределению структур между правой и левой сторонами (Levin et al., 1995; Logan et al., 1998; Ryan et al., 1998).

Раннее развитие млекопитающих

Яйцеклетки млекопитающих — одни из самых мелких в животном мире, что осложняет работу с ними. Например, диаметр зиготы человека, практически не различимой глазом, составляет всего 100 мкм, т. е. менее чем 0,001 от объема яйцеклетки *Xenopus laevis*. Кроме того, в отличие от яйцеклеток мор-

? Загадки развития

Настоящая загадка заключается в том, какие факторы отвечают за создание исходной асимметрии Shh или Fgf8. Интересно, что самые первые признаки появления асимметрии обнаруживают во время формирования Гензеновского узелка. При этом происходит самоорганизация клеток, экспрессирующих Fgf8 и Shh, таким образом, что они сходятся на правой стороне узелка (Cui et al., 2009; Gros et al., 2009). Чем определена исходная асимметрия на данный момент, не известно. Возможно, есть некий хемоаттрактант для клеток или существуют физические силы, вызывающие смещение клеток в области Гензеновского узелка (Gros et al., 2009; Tsikolia et al., 2012; Otto et al. 2014). Выберите сторону и проверьте предположение.

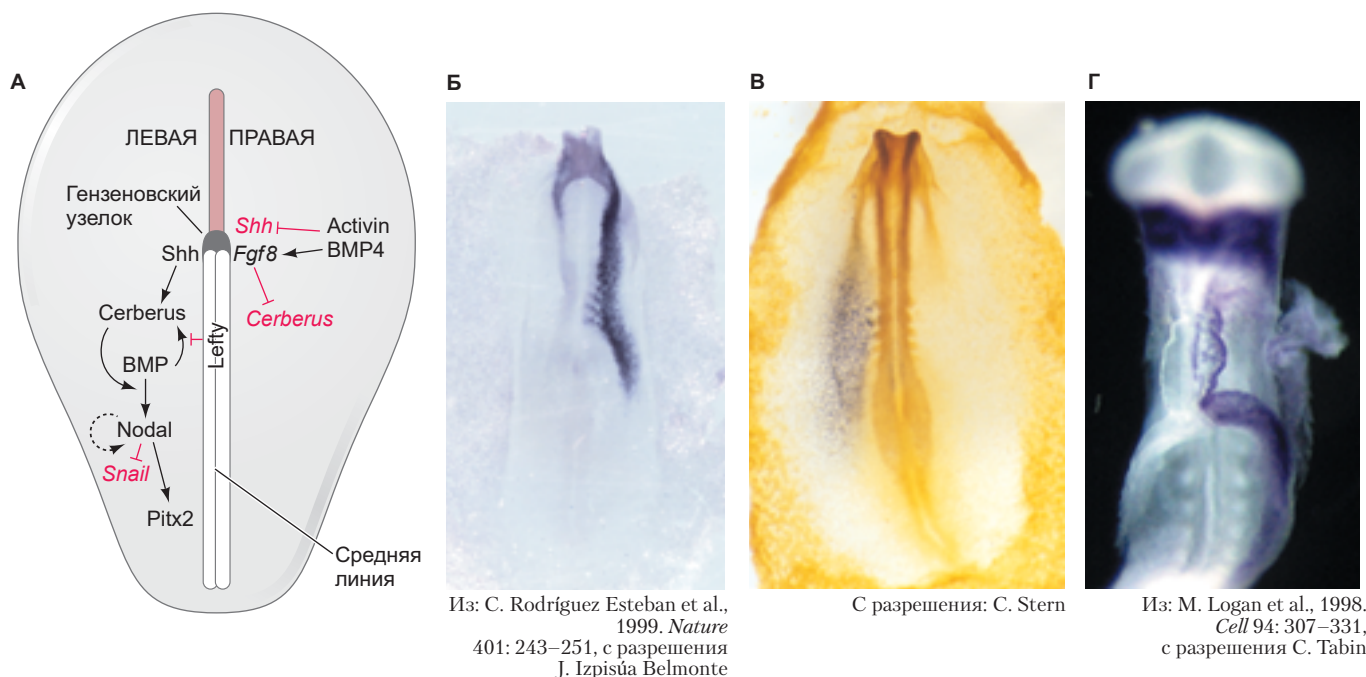


Рис. 12.9. Модель формирования лево-правой асимметрии куриного зародыша. **А.** На левой стороне Гензеновского узелка Sonic hedgehog (Shh) активирует Cerberus, что приводит к запуску работы факторов BMP, вызывающих экспрессию Nodal. В присутствии Nodal происходит активация гена *Pitx2* и синтез соответствующего белка. Белок Pitx2 можно обнаружить в зачатках различных органов; он определяет, где будет сформирована левая сторона. На правой стороне эмбриона экспрессируется активин и его рецептор (activating receptor IIa). Их экспрессия приводит к активации Fgf8 — белка, подавляющего активность Cerberus, в отсутствие которой не происходит экспрессия Nodal и Pitx2. **Б.** Выявление локализации мРНК Cerberus в целом эмбрионе методом гибридизации *in situ*. Вид с вентральной стороны (вид снизу, поэтому кажется, что Cerberus экспрессируется справа). Вид с дорсальной стороны, паттерн экспрессии слева. **В.** Выявление экспрессии Nodal (пурпурный цвет) в целом зародыше курицы методом гибридизации *in situ*. мРНК Nodal выявлена только в мезодерме боковой пластинки (латеральной мезодерме) на левой стороне эмбриона. Вид с дорсальной стороны. **Г.** Выявление экспрессии Pitx2 методом гибридизации *in situ* на более поздних стадиях развития эмбриона курицы. Вид с вентральной стороны. На данной стадии развития сердце уже сформировано и экспрессию Pitx2 можно обнаружить только в клетках левой стороны сердечной трубки, а в тканях, расположенных в более антериорных областях, его экспрессия симметрична. (Рис. А по данным: A. Raya and J. C. Izpisua Belmonte, 2004. *Mech Dev* 121: 1043–1054.)

ских ежей или лягушек, яйцеклетки млекопитающих образуются в крайне небольшом количестве. Так, у одной самки млекопитающего обычно одновременно овулирует не более 10 ооцитов, что осложняет проведение биохимических исследований в связи с трудоемкостью набора достаточного количества материала. Еще одно затруднение в том, что развитие эмбрионов плацентарных млекопитающих происходит внутри организма матери, а не во внешней среде (хотя до стадии имплантации эмбрионы можно культивировать и изучать в условиях *in vitro*). Большая часть исследований, посвященных развитию млекопитающих, была проведена на мышах, так как их легко разводить и размножать в условиях лаборатории, к тому же они приносят несколько потомков в одном помете.

Дробление у млекопитающих

До оплодотворения ооцит млекопитающих, окруженный клетками кумулюса, покидает яичник и подхватывается ворсинками воронки яйцевода для перемещения в яйцевод (рис. 12.10). Оплодотворение происходит в ампулярной части яйцевода, близкой к яичнику. Деления созревания (деления мейоза) завершаются после проникновения сперматозоида внутрь яйцеклетки, а первое деление дробления начинается примерно через сутки после оплодотворения (см. рис. 7.32). Ориентация первой борозды деления дробления зависит от места вхождения спер-

матозоида (Piotrowska and Zernicka-Goetz, 2001), а у мышей для запуска первого деления дробления необходима микроРНК (miRNA-34c), поступающая из сперматозоида. Предположительно, микроРНК связывает и ингибирует белок Bcl-2 который препятствует, наступлению S-фазы клеточного цикла (Liu et al., 2012). Два ядра, образующиеся в результате первого деления, являются первыми ядрами, содержащими полный геном, поскольку гаплоидные пронуклеусы при встрече не сливаются, а сразу приступают к формированию метафазной пластинки (см. гл. 7).

УНИКАЛЬНЫЙ ХАРАКТЕР ДРОБЛЕНИЯ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Дробление млекопитающих — одно из самых медленных в животном мире, период между делениями составляет 12–24 ч. Биение ресничек в яйцевоме обеспечивает перемещение эмбрионов в матку, во время которого начинается дробление. Помимо медленного деления клеток другой отличительной особенностью дробления млекопитающих является уникальная ориентация бластомеров относительно друг друга. У большинства млекопитающих первая борозда проходит меридионально, в то время как при втором делении дробления в одном бластомере борозда проходит меридионально, а в другом — экваториально (рис. 12.11). Такой тип дробления называют ротационным (Gulyas, 1975).

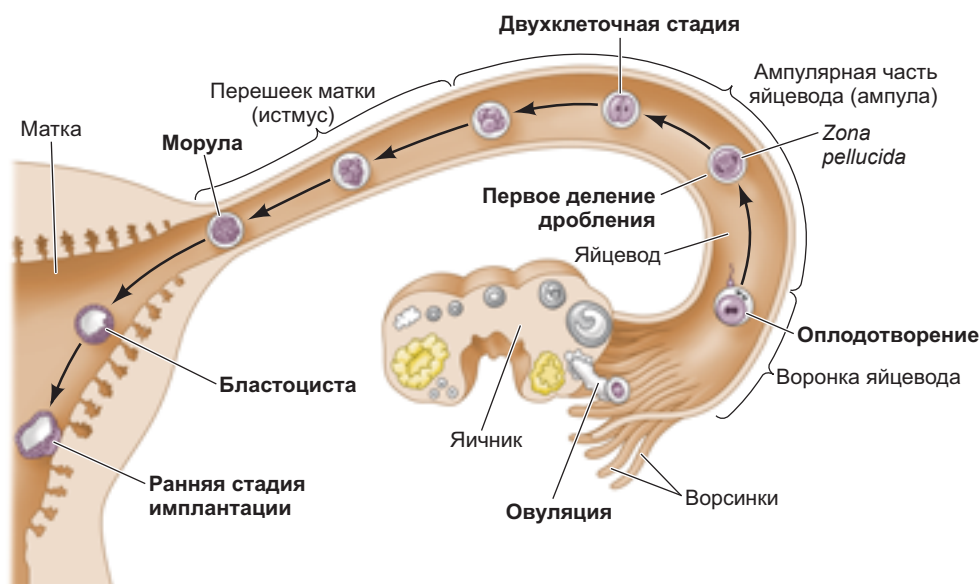


Рис. 12.10. Развитие эмбриона человека от оплодотворения до имплантации. Компактизация происходит на четвертое сутки на стадии 10 клеток. Эмбрион вылупляется из *zona pellucida* после попадания в матку. Во время перемещения в матку оболочка предохраняла эмбрион от преждевременного прикрепления к стенке яйцевода. (По данным: H. Tuchmann-Duplessis et al., 1971. *Embryogenesis. Illustrated Human Embryology*, vol 1. Springer: New York.)

Еще одно важное отличие дробления млекопитающих от дробления анимниот в асинхронности делений клеток. Бластомеры млекопитающих делятся в разное время. Таким образом, не происходит экспоненциального увеличения числа клеток (от 4 до 8), но в эмбрионе часто можно насчитать нечетное число бластомеров. Кроме того, в отличие от животных, развивающихся быстрее, у млекопитающих собственный геном активируется на ранних стадиях дробления, так как зиготические белки необходимы для дробления и развития. Белки, унаследованные от матери, могут сохраняться на протяжении практически всего дробления и в дальнейшем играть важную роль в развитии. У мышей и коз активация зиготических генов начинается на стадии поздней зиготы и продолжается на стадии двух бластомеров (Zeng and Schultz, 2005; Rother et al., 2011). У человека активация собственного генома происходит несколько позже (на стадии восьми бластомеров) (Pikó and Clegg, 1982; Braude et al., 1988; Dobson et al., 2004).

КОМПАКТИЗАЦИЯ

Одно из важнейших событий раннего развития млекопитающих — компактизация. На стадии восьми клеток у мыши бластомеры расположены рыхло (рис. 12.12А–В). Однако после третьего деления дробления бластомеры меняют поведение. В них начинается синтез белков клеточной адгезии, например Е-кадгерина, что приводит к сближению и уплотнению бластомеров до образования компактного шара из клеток (рис. 12.12Г; Peyrieras et al., 1983; Fleming et al., 2001). Такую плотную упаковку дополнительно стабилизирует образование плотных контактов между наружными клетками. Между внутренними клетками формируются щелевые контакты, которые обеспечивают транспорт ионов и малых молекул между клетками (наподобие того, как это происходит на стадии ранней бластулы у рыб).

Бластомеры в составе компактного восьмиклеточного эмбриона делятся, и образуется 16-клеточ-

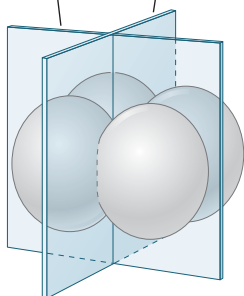
ная морула (рис. 12.12Д). Морула состоит из небольшой группы внутренних клеток, окруженных более многочисленными наружными клетками (Barlow et al., 1972). Большинство потомков наружных клеток станет клетками трофобласта (трофоэктодермы), в то время как из внутренних клеток будет образована внутренняя клеточная масса (ВКМ). ВКМ, из которой будет формироваться зародыш, располагается на одной стороне кольца клеток трофобласта. В результате такого неравномерного расположения клеток ВКМ образуется бластоциста — еще одна отличительная черта развития млекопитающих (рис. 12.12Е, Ж; см. также рис. 5.7).

Клетки трофобласта не участвуют в образовании эмбриональных структур, вместо этого они формируют хорион, внезародышевую оболочку и часть плаценты, которая позволяет плоду получать кислород и питание от матери. Хорион выделяет также гормоны и регуляторы иммунного ответа, позволяющие ему закрепиться в матке и препятствующие его отторжению организмом матери.

Важно помнить, что в результате дробления образуется популяция клеток, обеспечивающих прикрепление эмбриона к матке. Таким образом, появление трофоэктодермы — первый случай дифференцировки клеток во время развития млекопитающих. На ранних стадиях дробления, например на стадии двух клеток, каждый бластомер способен давать начало как клеткам-предшественникам ВКМ, так и клеткам трофобласта. Такие клетки называют тотипотентными (от лат. «способный на все»). Клетки ВКМ плюрипотентны (от лат. «способные на многое»): каждая клетка в составе ВКМ может дать клетки любого зародышевого листка, но не способна дифференцироваться в клетки трофобласта. Плюрипотентные клетки ВКМ могут быть выделены и помещены в культуру, где при соответствующих условиях они будут бесконечно самообновляться, поддерживая плюрипотентность, проявляя таким образом свойства эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) (см. гл. 5).

А Иголкожие и амфибии

Плоскость дробления II Плоскость дробления I



Б Млекопитающие

Плоскость дробления IIIA Плоскость дробления I

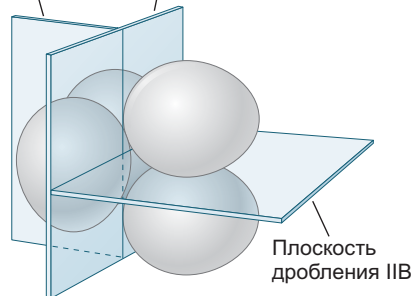


Рис. 12.11. Сравнение ранних этапов дробления (А) иголокожих и амфибий (радиальное дробление) с (Б) дроблением млекопитающих (ротационное дробление). У нематод тоже ротационное дробление, но стадия бластоцисты, характерная для млекопитающих, у них отсутствует (По данным: B. J. Gulyas, 1975. *J Exp Zool* 193: 235–248.)

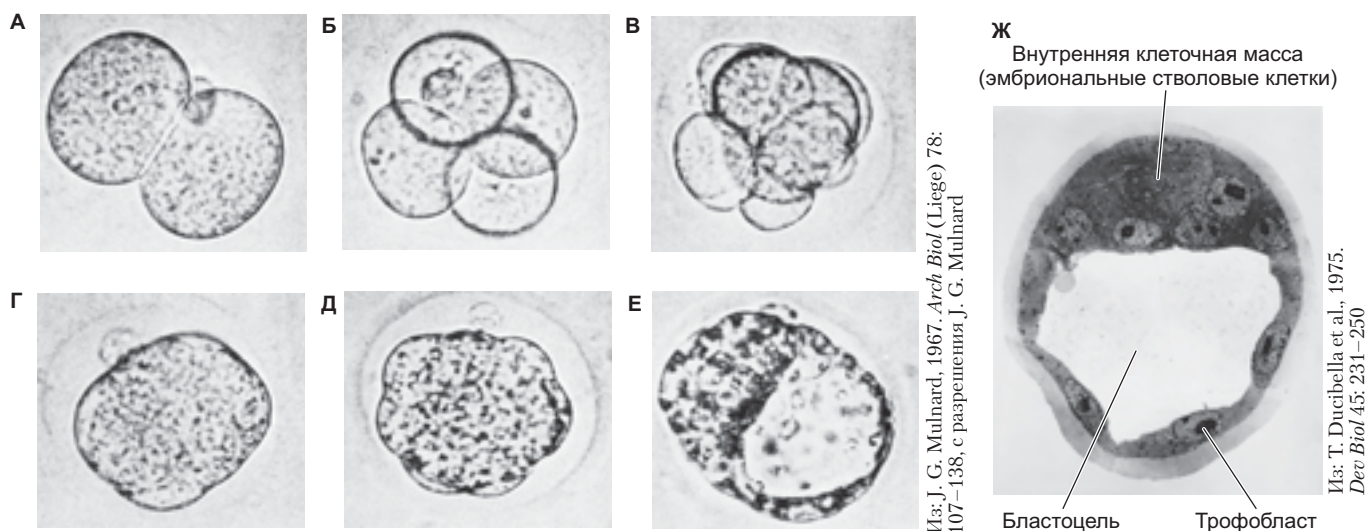


Рис. 12.12. Дробление эмбриона мыши *in vitro*. **А.** Стадия двух бластомеров. **Б.** Стадия четырех бластомеров. **В.** Стадия восьми бластомеров (ранняя). **Г.** Стадия восьми бластомеров (компактизация). **Д.** Морула. **Е.** Бластоциста. **Ж.** Микрофотография среза бластоцисты, прошедшего через центр, полученная с помощью просвечивающего электронного микроскопа

? Загадки развития

Мы обсуждали плацентарных млекопитающих (Eutheria), таких как мыши и люди, у которых плод развивается в организме матери. Но как насчет однопроходных млекопитающих (таких как утконос), которые откладывают яйца, или сумчатых млекопитающих (таких как кенгуру), у которых беременность проходит крайне быстро? Есть ли у них бластоциста?

Трофобласт или ВКМ? Первое решение, определяющее всю дальнейшую жизнь

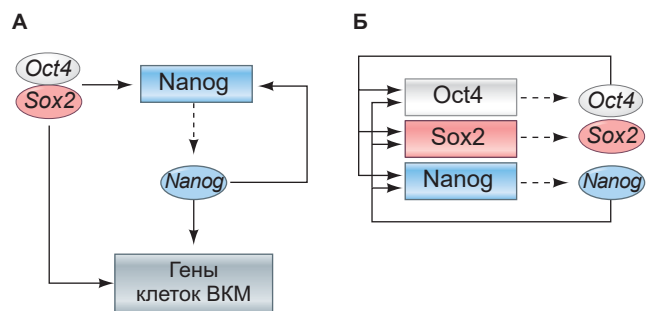
Согласно мнению философа и теолога Серена Кьеркегора (Søren Kierkegaard), наше самоопределение заключается в том выборе, который мы совершаем. Видимо, эмбрионы уже знают об этом. Решение стать трофобластом или ВКМ — первое в жизни млекопитающих. Как было описано в гл. 5, клетки эмбриона должны утратить свойство плюрипотентности и принять решение, «кем они хотят стать, когда вырастут» (см. рис. 5.8). При первом выборе будущего пути в клетках происходит взаимное (реципрое) подавление транскрипции генов *Oct4* и *Cdx2*, приводящее к тому, что одни клетки станут трофобластом, а другие — плюрипотентными клетками ВКМ. Во втором случае в каждой клетке ВКМ помимо прочих белков обязательно начинается синтез белка Nanog или Gata6. Первый отвечает за поддержание плюрипотентности, а второй — за дифференцировку в первичную энтодерму (Ralston and Rossant, 2005; Rossant, 2016).

До образования бластоцисты транскрипционные факторы *Cdx2* и *Oct4* присутствовали во всех бластомерах (Niwa et al., 2005; Dietrich and Hiiragi, 2007; Ralston and Rossant, 2008), следовательно, любой бластомер мог стать либо трофоэктодермой либо ВКМ (Hiiragi and Solter, 2004; Motosugi et al., 2005; Kurotaki et al., 2007). В любом случае после того как выбор сделан, в клетках происходит активация экспрессии соответствующего набора генов. Как было сказано выше, плюрипотентность клеток ВКМ находится под контролем трех транскрипционных факторов — *Oct4*, *Sox2* и *Nanog*. Белки, кодируемые соответствующими генами, связываются с энхансером собственных генов, чтобы усилить их экспрессию, в то же время активируя энхансеры друг друга (рис. 12.13). В результате, когда происходит активация одного гена, другие гены также активируются. *Sox2* и *Oct4* действуют совместно, так как образуют димер, связывающийся с энхансером, смежным с *Nanog*, что приводит к активации генов, необходимых для поддержания плюрипотентного состояния эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), и подавлению тех генов, продукты которых приводят к дифференцировке. (Marson et al., 2008; Kagey et al., 2010; Adamo et al., 2011; Young, 2011.)

КАВИТАЦИЯ

У мышей зародыш будет развиваться из клеток внутренней клеточной массы, обособившихся на стадии 16 бластомеров, и клеток, отделяющихся от наружных клеток морулы при переходе к стадии 32 бластомеров (Pedersen et al., 1986; Fleming,

Рис. 12.13. Схема действия основных факторов, поддерживающих клетки ВКМ в плюрипотентном состоянии. **А.** Схема прямой связи, в которой димер Oct4/Sox2 активирует ген *Nanog*. Белок Nanog активирует собственный ген, а также гены, отвечающие за поддержание плюрипотентности. **Б.** Схема взаимной регуляции синтеза факторов. Каждый из факторов Oct4, Sox2 и *Nanog* активирует синтез собственного белка и двух оставшихся факторов (По данным: L. A. Boyer et al., 2005. *Cell* 122: 947–956.)



1987; McDole et al., 2011). Клетки ВКМ дают начало как самому зародышу, так и связанным с ним внезародышевым оболочкам — желточному мешку, аллантоису и амниону. На стадии 64 клеток ВКМ (насчитывающая около 13 клеток в составе) и клетки трофобласта становятся двумя отдельными клеточными слоями, между которыми не происходит обмен клетками (Dyce et al., 1987; Fleming, 1987). ВКМ поддерживает трофобласт, вырабатывая белки, стимулирующие пролиферацию клеток трофобласта (Tanaka et al., 1998).

Исходно в моруле внутренняя полость отсутствует. Однако во время процесса, называемого кавитацией, клетки трофобласта секретируют жидкость во внутреннее пространство морулы и формируется полость бластоцисты, аналогичная бластоцеллю. В мембране клеток трофобласта располагаются натриевые насосы (Na^+/K^+ -АТФазы и Na^+/H^+ -обменник), которые осуществляют транспорт Na^+ в центральную полость. Последующее накопление Na^+ создает осмотический градиент и способствует поступлению воды извне, что приводит к увеличению полости (Borland, 1977; Ekkert et al., 2004; Kawagishi et al., 2004). Интересно, что активность натриевых насосов, по-видимому, стимулируют клетки яйцевода, по которым эмбрион перемещается на пути к матке (Xu et al., 2004). По мере увеличения полости бластоцисты внутренняя клеточная масса оказывается сосредоточенной на одной стороне кольца клеток трофобласта, таким образом формируется характерная бластоциста млекопитающих.

Гастрюляция у млекопитающих

И птицы, и млекопитающие — потомки видов рептилий. Поэтому неудивительно, что развитие этих групп животных имеет много общих черт. Удивляет то, что гастрюляционные движения, характерные для птиц и рептилий, сформировавшиеся как адаптация к большому количеству желтка в яйцеклетке, сохраняются у млекопитающих, причем даже у плацентарных, яйцеклетка которых лишена желтка. Можно представить, что ВКМ располагается на воображаемом желтке и следует тем инструкциям, которые были свойственны их предкам.

МОДИФИКАЦИЯ ДЛЯ РАЗВИТИЯ ВНУТРИ ДРУГОГО ОРГАНИЗМА

Эмбрион млекопитающих получает питательные вещества непосредственно от матери и не зависит от накопленного желтка. Такая особенность повлекла за собой существенные изменения анатомического строения тела матери, например расширение нижней части яйцевода с образованием матки, а также привела к образованию специализированного органа (плаценты), состоящего из клеток как матери, так и плода и предназначенного для транспорта питательных веществ. Происхождение тканей млекопитающих в раннем развитии схематично представлено на рис. 12.14. Как было показано выше, первые различия появились еще при разделении клеток эмбриона на трофобласт и ВКМ. Трофобласт, проходя через несколько стадий развития, в итоге превращается в хорион — часть плаценты эмбрионального происхождения. Клетки трофобласта стимулируют клетки стенки матки образовывать материнскую часть плаценты (децидуальную ткань). Децидуальная ткань обогащается кровеносными сосудами, которые будут снабжать эмбрион кислородом и питательными веществами. ВКМ дает начало эпибласту и гипобласту (первичной энтодерме). Клетки гипобласта образуют клетки желточного мешка, в то время как из клеток эпибласта будут сформированы тело зародыша, амнион и аллантоис.

ПЕРВИЧНАЯ ЭНТОДЕРМА: ГИПОБЛАСТ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Еще до имплантации бластоцисты в стенку матки происходит первая дифференцировка ее клеток. Этот период развития называется **преимплантационным**, бластоциста еще свободно перемещается в матке и взаимодействует с эндометрием. Сначала происходит разделение клеток ВКМ на два слоя (рис. 12.15). Нижний слой, взаимодействующий с полостью бластоцисты, называют первичной энтодермой (PrE), и он гомологичен гипобласту эмбриона курицы. Верхний слой носит название эпибласта. Первичная энтодерма будет принимать участие в формировании желточного мешка, как и гипобласт курицы, будет

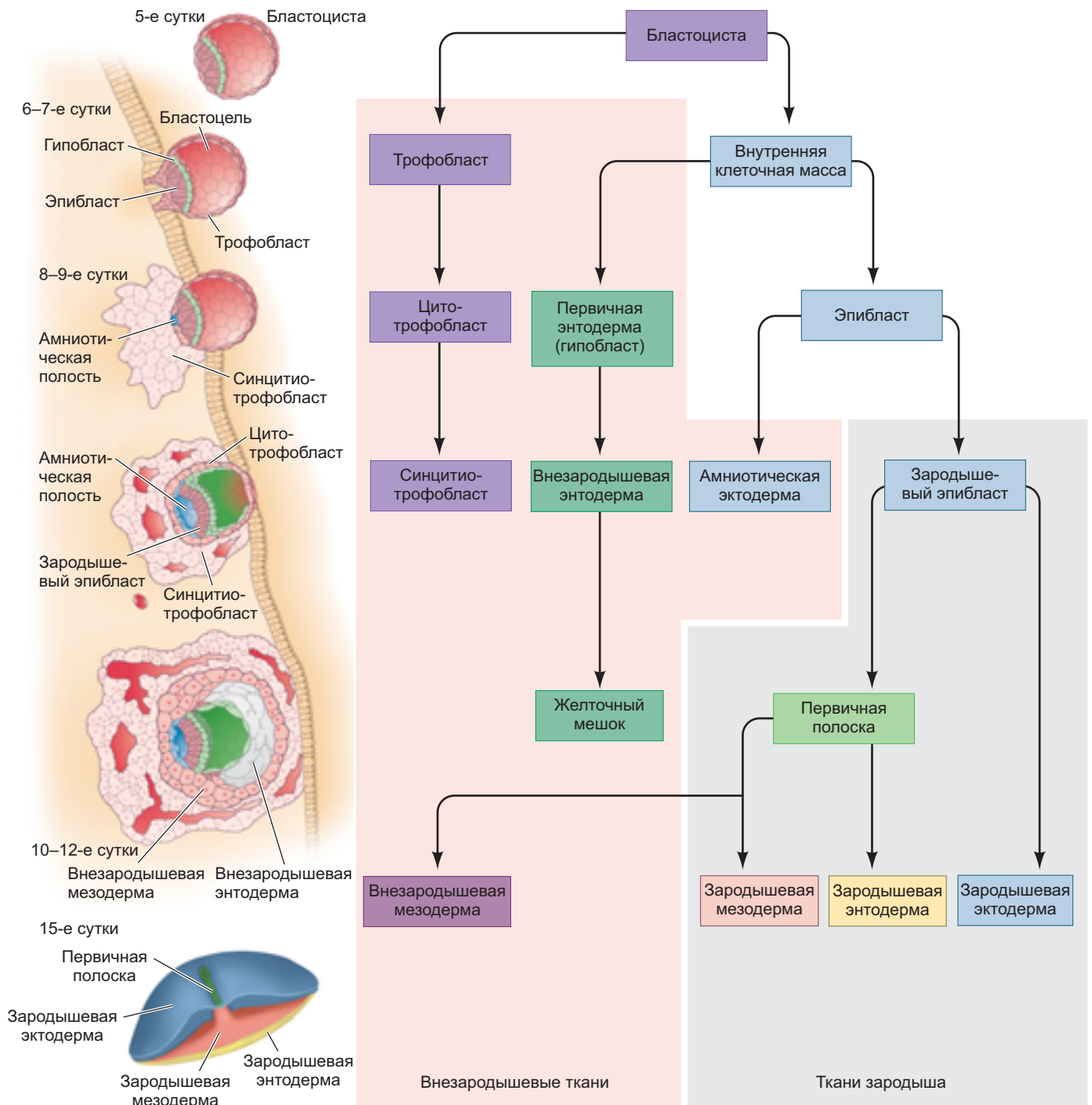


Рис. 12.14. Формирование зародышевых и внезародышевых тканей на ранних этапах развития эмбриона человека. На 5–9-е сутки: имплантация бластоцисты. От внутренней клеточной массы отделяются клетки гипобласта, выстилающего полость бластоцисты и формируют внезародышевую энтодерму желточного мешка, и двуслойный бластодиск (эпибласт и гипобласт). На 10–12-е сутки: трофобласт разделяется на цитотрофобласт, который образует ворсинки, и синцитиотрофобласт, который внедряется в ткани матки и образует хорион. На 12–15-е сутки: гастрুলация и образование первичной полоски. В это время эпибласт разделяется на амниотическую эктодерму, выстилающую амниотическую полость, и зародышевый эпибласт. Именно из зародышевого эпибласта образуются экто-, мезо- и энтодерма, а также половые клетки. Внезародышевая энтодерма участвует в формировании желточного мешка. (По данным: W. P. Luckett, 1978. *Am J Anat* 152: 59–97.)

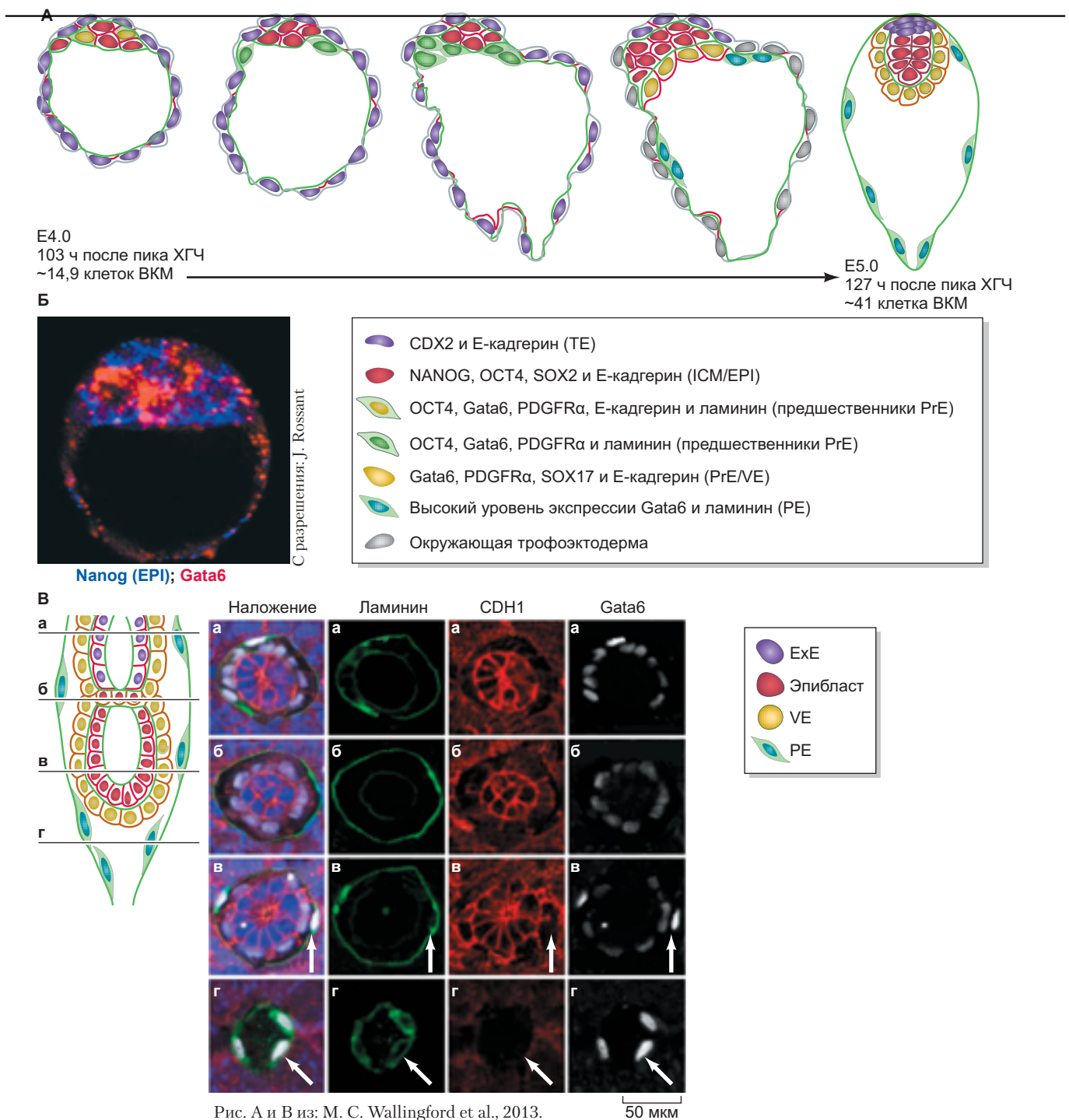


Рис. А и В из: M. C. Wallingford et al., 2013.
Dev Dyn 242: 1110–1120

Рис. 12.15. Дифференцировка клеток преимплантационного эмбриона. **А.** Изменения морфологии и экспрессии генов в доимплантационном развитии эмбриона мыши на 3,75–4,75 суток после оплодотворения. Трофэктодерма (сиреневый) — наружный слой. Клетки ВКМ сначала перемешаны, но затем разделяются на верхний слой — эпибласт (будет формировать тело эмбриона, красный) и нижний слой — первичную энтодерму (примет участие в образовании висцеральной энтодермы (желтый) под эпибластом и париетальной энтодермой (синий), распространяющейся по внутренней поверхности трофэктодермы). **Б.** Случайная экспрессия *Nanog* (синий цвет для эпибласта) и *Gata6* (красный цвет для первичной энтодермы) в составе ВКМ эмбриона через 3,5 суток после оплодотворения (ранняя бластоциста). **В.** Иммунофлуоресцентное окрашивание поперечных срезов (а–г) пятисуточного эмбриона. Срезы показаны черными линиями (а–г на схеме слева). Дифференциальная экспрессия *Gata6* характерна для многих типов клеток в составе преимплантационной бластоцисты. Стрелки указывают на париетальную энтодерму. ICM/EPI — ВКМ/эпибласт; TE — трофэктодерма; PrE — первичная энтодерма; PPrE — периферическая первичная энтодерма; PE — париетальная энтодерма; VE — висцеральная энтодерма; ExE — внезародышевая энтодерма; CDH1 — E-кадгерин

задействована в определении места начала гаструляции, регуляции клеточных движений в эпибласте, а также образовании клеток крови. Кроме того, первичная энтодерма подобно гипобласту курицы является преимущественно внезародышевой и не вносит существенный вклад в образование тканей эмбриона (Stern and Downs, 2012).

Станет клетка ВКМ эпибластом или первичной энтодермой, зависит от того, когда она вошла в состав ВКМ (Bruce and Zernicka-Goetz, 2010; Morris et al., 2010). Клетки, занимающие внутреннее положение во время перехода от стадии восьми к стадии 16 бластомеров, становятся плюрипотентными клетками эпибласта, в то время как первичная энтодерма (гипобласт) образована клетками, вошедшими в состав ВКМ во время следующего деления (при переходе от стадии 16 к стадии 32 бластомеров) (см. рис. 12.15А). На этой стадии ВКМ представляет из себя мозаику будущих клеток эпибласта, экспрессирующих транскрипционный фактор *Nanog*, поддерживающий плюрипотентное состояние, и первичной энтодермы, экспрессирующей транскрипционный фактор *Gata6*; через сутки (на 4,5 суток развития) происходит разделение слоев (см. рис. 12.15Б; Chazaud et al., 2006).

Эпибласт и первичная энтодерма образуют **двухслойный зародышевый диск** (рис. 12.16А). Клетки первичной энтодермы распространяются и выстилают полость бластоцисты и впоследствии дают начало желточному мешку. Клетки первичной энтодермы, контактирующие с клетками эпибласта, будут дифференцироваться в **висцеральную (внезародыше-**

вую) энтодерму, а клетки желточного мешка, взаимодействующие с трофобластом, — в **париетальную энтодерму** (см. рис. 12.15). Слой клеток эпибласта разделяется небольшими углублениями на зародышевый эпибласт и остальные клетки эпибласта, которые будут образовывать амнион. Когда амнион сформирован, амниотическую полость заполняет амниотическая жидкость, которая выполняет функции амортизатора и предохраняет развивающийся эмбрион от высыхания. Считается, что зародышевый эпибласт состоит из клеток, которые будут формировать тело зародыша, и во многом похож на эпибласт птиц.

Гаструляция начинается на заднем конце эмбриона, именно в этом месте возникает первичная полоска (рис. 12.16Б, В). Как и в развитии птиц, клетки мезодермы и энтодермы млекопитающих происходят из клеток эпибласта, претерпевших эпителио-мезенхимный переход, в ходе которого утратили экспрессию Е-кадгерина и мигрировали через первичную полоску как единичные мезенхимные клетки, а не в составе пласта (рис. 12.17; Burdsal et al., 1993; Williams et al., 2012). В конце концов как утолщение на переднем конце первичной полоски формируется **узелок**. Клетки, происходящие из области узелка, дают начало хорде. Однако в отличие от хорды у птиц, считается, что клетки, формирующие хорду у мышей, сначала встраиваются в энтодерму первичной кишки (Jurand, 1974; Sulik et al., 1994). Эти клетки видны как полоса мелких ресничных клеток, распространяющихся вперед от узелка. Они образуют хорду, сходясь медиально и «отпочковываясь» в дорсальном направлении от крыши кишки. У от-

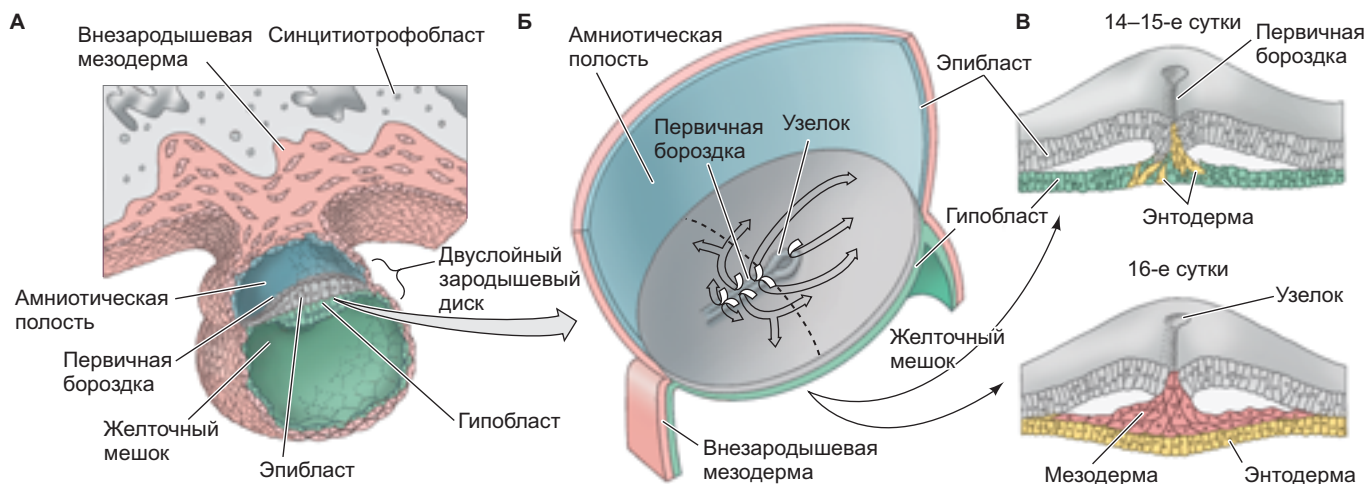


Рис. 12.16. Строение амниона и движение клеток во время гаструляции у человека. **А, Б.** Взаимодействие матки и эмбриона человека на 15-й день беременности. **А.** Сагиттальный срез вдоль средней линии. **Б.** Вид сверху на дорсальную сторону эмбриона. Движение клеток эпибласта через первичную полоску и узелок, а также под эпибластом накладывается при взгляде сверху. **В.** На 14–15-е сутки происходит выселение клеток эпибласта, в результате чего они замещают клетки гипобласта, участвующие в образовании стенки желточного мешка, а на 16-е сутки происходит образование слоя мезодермы из выселяющихся клеток. (По данным: W. J. Larsen, 1993. *Human Embryology*. Churchill Livingstone: New York.)

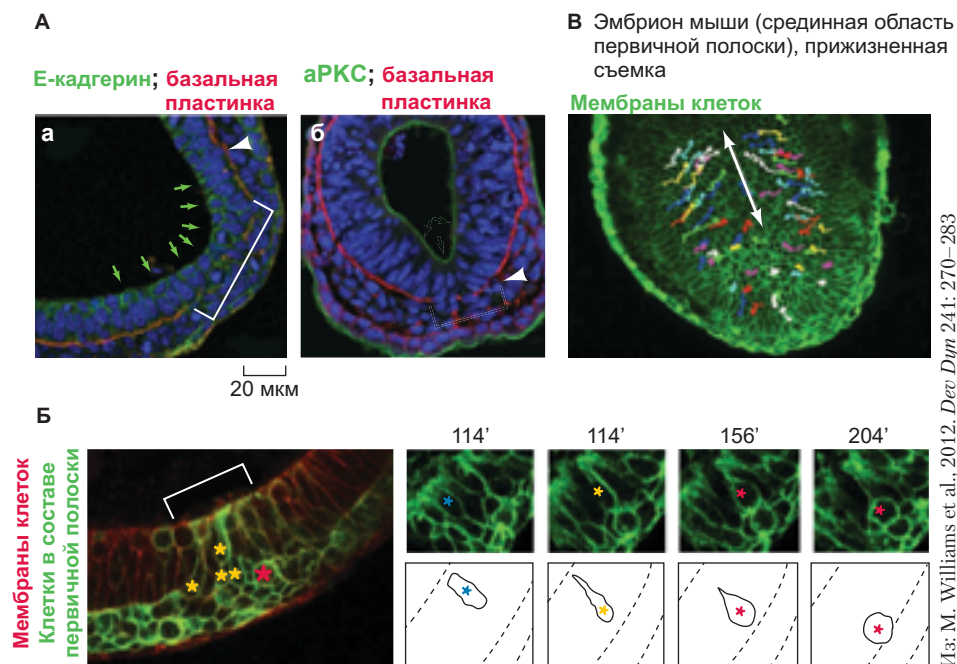


Рис. 12.17. Эпителио-мезенхимный переход в первичной полоске предшествует образованию мезодермы. **А.** У эмбриона мыши клетки эпибласта экспрессируют Е-кадгерин и маркеры апикальных поверхностей клеток, например белок апикальной полярности аРКС (*зеленые стрелки*). Частичное разрушение базальной пластинки (красная флуоресценция, коллаген IV) показывает ту часть первичной полоски (*скобки*), где клетки эпибласта претерпевают эпителио-мезенхимный переход и мигрируют вглубь с образованием слоя мезодермы, в клетках которого отсутствует экспрессия Е-кадгерина и аРКС (*белая стрелка*). **Б.** Использование четырехмерной прижизненной визуализации эмбрионов мыши в культуре позволяет проследить изменение морфологии клеток эпибласта, когда они осуществляют переход из эпителиального состояния (*синие звездочки*), через бутылковидные клетки с суженной апикальной поверхностью (*желтые звездочки*) в округлые мезенхимные клетки, входящие в слой мезодермы (*красные звездочки*). **В.** Наблюдение за движением клеток (*цветные линии*) во время образования первичной полоски показывает, что происходит интеркаляция по средней линии первичной полоски, что приводит к удлинению передне-задней оси (*двойная стрелка*)

дельных видов млекопитающих сроки образования мезодермы существенно различаются. У человека миграция клеток, образующих мезодерму, начинается не ранее 16 суток развития, в то время как эмбрион мыши на этом же сроке уже почти сформирован и готов к рождению (см. рис. 12.16В; Larsen, 1993).

Формирование осей тела у млекопитающих

Биолог и поэт Мирослав Голуб (1990) заметил:

«Между пятыми и десятыми сутками развития кучка стволовых клеток дифференцируется во все ткани и органы зародыша, а также происходит разметка общего плана строения тела эмбриона [мышь]. Это отдаленно напоминает кусок железа, превращающийся в космический корабль. На самом деле данный процесс — самое необыкновенное чудо, которое мы еще способны представить и принять, и в то же время настолько обычное событие, что нам прихо-

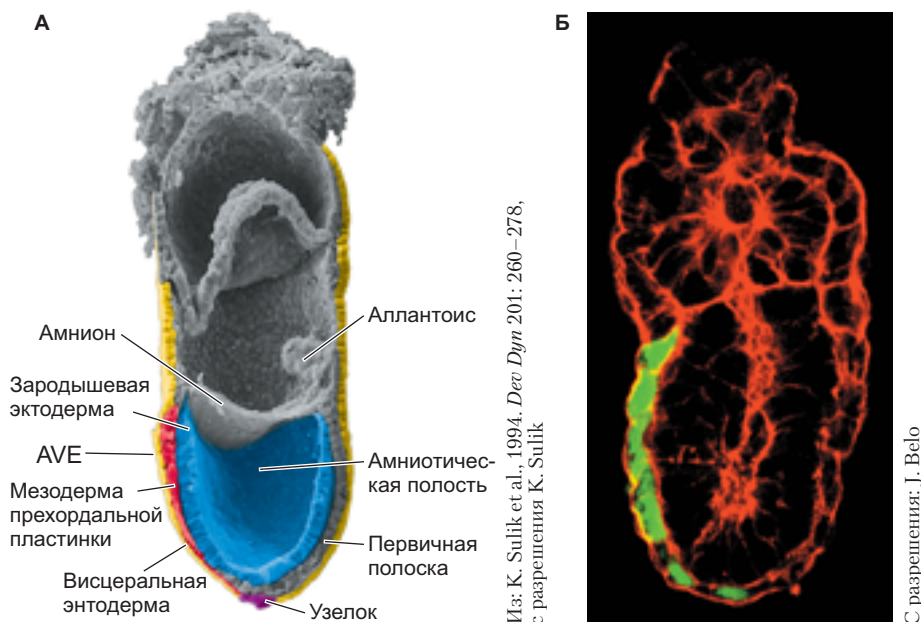
дится заставлять себя задумываться о невероятности этого чуда».

Мы только начинаем по-настоящему понимать, насколько удивительны такие процессы.

ПЕРЕДНЕ-ЗАДНЯЯ ОСЬ: ДВА СИГНАЛЬНЫХ ЦЕНТРА

Формирование передне-задней оси тела млекопитающих наиболее детально изучено на мышах. Однако строение эпибласта мыши отличается от эпибласта человека тем, что имеет форму чаши, а не диска. В то время как эмбрион человека очень похож на эмбрион курицы, эмбрион мыши выглядит как капля, заключенная в первичную энтодерму (**рис. 12.18А**).

В эмбрионе млекопитающих присутствует два сигнальных центра: один в узелке (эквивалентен Гензеновскому узелку и организатору амфибий) и один в **передней висцеральной энтодерме** (ante-



Из: K. Sulik et al., 1994, *Dev Dyn* 201: 260–278, с разрешения K. Sulik

С разрешения: J. Belo

Рис. 12.18. Формирование осей и хорды у мыши. **А.** У семисуточного эмбриона мыши дорсальная поверхность эпибласта (зародышевая эктодерма) выстилает амниотическую полость. Вентральная поверхность эпибласта взаимодействует с новообразованной мезодермой. При такой чашеобразной организации зародыша энтодерма покрывает поверхность эмбриона. Узелок располагается на дне чаши и принимает участие в образовании хордомезодермы. Два сигнальных центра — узелок и зона AVE (передняя (антериорная) висцеральная энтодерма) располагаются на противоположных сторонах чаши. В конце концов они окажутся связанными формирующейся хордой. На заднем (каудальном) конце эмбриона образуется аллантаис. **Б.** Флуоресцентное изображение, полученное с помощью конфокального микроскопа, показывает экспрессию гена *Cerberus*. Визуализацию экспрессии обеспечивает слияние *Cerberus* с *GFP*. На этой стадии клетки, синтезирующие *Cerberus* (зеленые), мигрируют в самую переднюю область висцеральной энтодермы

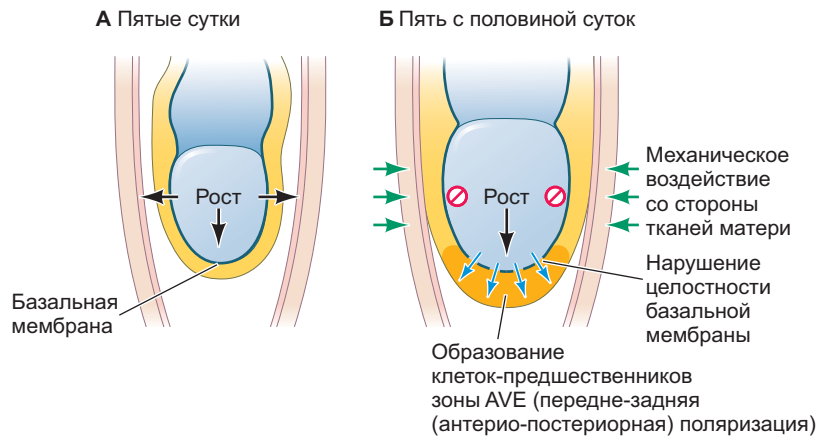
rior visceral endoderm) (Beddington and Robertson, 1999; Foley et al., 2000). Хотя у узелка и зоны AVE часть функций перекрывается, узелок, по-видимому, в первую очередь отвечает за нейральную индукцию и за определение передне-задней оси, в то время как зона AVE необходима для определения места образования первичной полоски (Bachiller et al., 2000).

Сигналы, вызывающие формирование первичной полоски, по-видимому, приходят из области взаимодействия внезародышевой эктодермы (производного трофобласта) с эпибластом. BMP4, выделяемый клетками внезародышевой эктодермы, вызывает синтез Wnt3a и Nodal в соседних клетках эпибласта. Однако зона AVE предотвращает воздействие Wnt3a и Nodal на переднюю область эпибласта путем синтеза антагонистов этих паракринных факторов. Антагонистами являются Lefty-1, Dickkopf и Cerberus (рис. 12.18Б; Brennan et al., 2001; Perea-Gomez et al., 2001; Yamamoto et al., 2004). Как и у амфибий, в эмбрионах млекопитающих передняя область защищена от воздействия Wnt. Таким образом, Wnt3a активирует экспрессию гена *Brachyury* в клетках заднего отдела эпибласта, что приводит к образованию клеток мезодермы (Bertocchini and Stern,

2002; Perea-Gomez et al., 2002). Как только узелок полностью сформирован, его клетки начинают синтезировать Chordin; позже клетки хордального выроста и задних отделов хорды дополнительно будут синтезировать Noggin. У мышей с дисфункцией обоих генов отсутствует передний мозг, нос и другие лицевые структуры.

Как же образуется зона AVE? Ответ неожиданный. Зону AVE и, следовательно, передне-заднюю ось тела млекопитающих, по-видимому, устанавливают факторы окружающей среды — форма матки. Матка ограничивает эмбрион так, что рост возможен только в одном направлении. Это удлинение эмбриона «вниз» приводит к разрушению внеклеточного матрикса и индукции экспрессии нового гена в самых дистальных клетках эпибласта (рис. 12.19). Продукты вновь экспрессирующихся генов вызывают миграцию клеток в переднем направлении и формирование зоны AVE. Было обнаружено, что если рост эмбриона не ограничен, то передне-задняя ось не образуется (Hiramatsu et al., 2013). Таким образом, механическая сила, создаваемая маткой, играет решающую роль в нормальном развитии эмбрионов млекопитающих.

Рис. 12.19. Образование клеток-предшественников зоны AVE путем механического стресса в эмбрионе мыши. **А.** На пятые сутки эмбриогенеза рост эмбриона ограничен формой матки и осуществляется в нескольких направлениях. **Б.** Примерно через 12 ч рост эмбриона ограничен и возможен только в проксимально-дистальном направлении. Базальная мембрана в дистальной области разрушается, в результате чего клетки эпибласта проникают в слой клеток висцеральной энтодермы (синие стрелки) и образуют клетки-предшественники зоны AVE (По данным: R. Hiramatsu et al., 2013. *Dev Cell* 27: 131–144.)



Ограничение передачи сигнала Nodal в задний отдел эмбриона связано с образованием первичной полоски в этой области, а подавление Nodal в передней части эмбриона связано с предотвращением образования первичной полоски спереди. Позже по мере развития Nodal все-таки начинает экспрессироваться и в переднем отделе и играет важную роль в формировании паттерна «голова—хвост». Одна из его ключевых функций — определение лево-правой асимметрии, например Nodal экспрессируется слева в клетках мезодермы боковой пластинки (латеральной мезодермы) в районе зачатка заднего мозга.

ПЕРЕДНЕ-ЗАДНЕЕ ПАТТЕРНИРОВАНИЕ: ГИПОТЕЗА НОХ-КОДА

У всех позвоночных животных передне-задняя ось обычно определяется экспрессией *Hox*-генов. Сочетание задне-переднего градиента FGF в сочетании с противоположным передне-задним градиентом ретиноевой кислоты в той области эмбриона, где расположена первичная полоска, приводит к дифференциальной активации экспрессии *Hox*-генов — гомологов гомеозисных генов (Hox-C генов) плодовой мухи (*Drosophila*) (см. гл. 9). Комплекс гомеозисных генов *Drosophila* на хромосоме 3 содержит кластеры *Antennapedia* и *bithorax* (см. рис. 9.24) и может быть рассмотрен как единая функциональная единица. (Действительно, у некоторых других насекомых, например, у мучного жука *Tribolium*, это целостная единая структура в физическом смысле.) Во всех изученных геномах млекопитающих содержится четыре комплекса *Hox*-генов на гаплоидный набор, расположенных на разных хромосомах (от *Hoxa* до *Hoxd* у мыши, от *HOXA* до *HOXD* у человека; см. Boncinelli et al., 1988; McGinnis and Krumlauf, 1992; Scott, 1992).

Порядок расположения генов на соответствующих хромосомах удивительно схож у насекомых

и у людей, как и паттерн экспрессии этих генов. Гены млекопитающих, гомологичные генам *labial*, *proboscipedia* и *deformed* у *Drosophila*, экспрессируются в передней части тела и на более ранних сроках развития, в то время как гены, гомологичные гену *AbdB* у *Drosophila*, экспрессируются в задних отделах и на более поздних сроках. Как и у плодовой мухи, у мыши отдельный набор генов кодирует факторы транскрипции, регулирующие формирование головных структур. У *Drosophila* это гены *orthodenticle* и *empty spiracles*. У мышей за формирование переднего и среднего мозга отвечают гены *Otx2* и *Emx*, гомологичные вышеупомянутым генам плодовой мухи (Kurokawa et al., 2004; Simeone, 2004).

Hox/HOX-гены млекопитающих пронумерованы от 1 до 13 с конца комплекса, экспрессирующегося в самых передних отделах тела. На рис. 12.20 показаны соответствия между гомеозисными генами *Drosophila* и мыши. У мыши эквивалентные гены в каждом из комплексов (такие как *Hoxa4*, *b4*, *c4* и *d4*) являются паралогами; предполагается, что четыре *Hox*-комплекса млекопитающих возникли в результате хромосомных дупликаций. Поскольку соответствие между *HomC* генов *Drosophila* и *Hox*-генов млекопитающих неполное, можно предположить, что независимые дупликации и делеции произошли после того, как эти две группы животных разошлись (Hunt and Krumlauf, 1992). Действительно, наиболее постериорно экспрессирующийся *Hox*-ген мыши (соответствующий гену *AbdB* дрозофилы) подвергался собственному набору дупликаций в некоторых хромосомах млекопитающих.

Hox-гены экспрессируются вдоль оси тела млекопитающих (в нервной трубке, нервном гребне, осевой мезодерме и покровной эктодерме) от передней границы заднего мозга до хвостового отдела. Границы экспрессии не определены четко, но *Hox*-гены, расположенные ближе к 3'-концу (гомологи генов *labial*, *proboscipedia* и *deformed* плодовой мухи), экспрессируются в более отдаленных антериорных от-

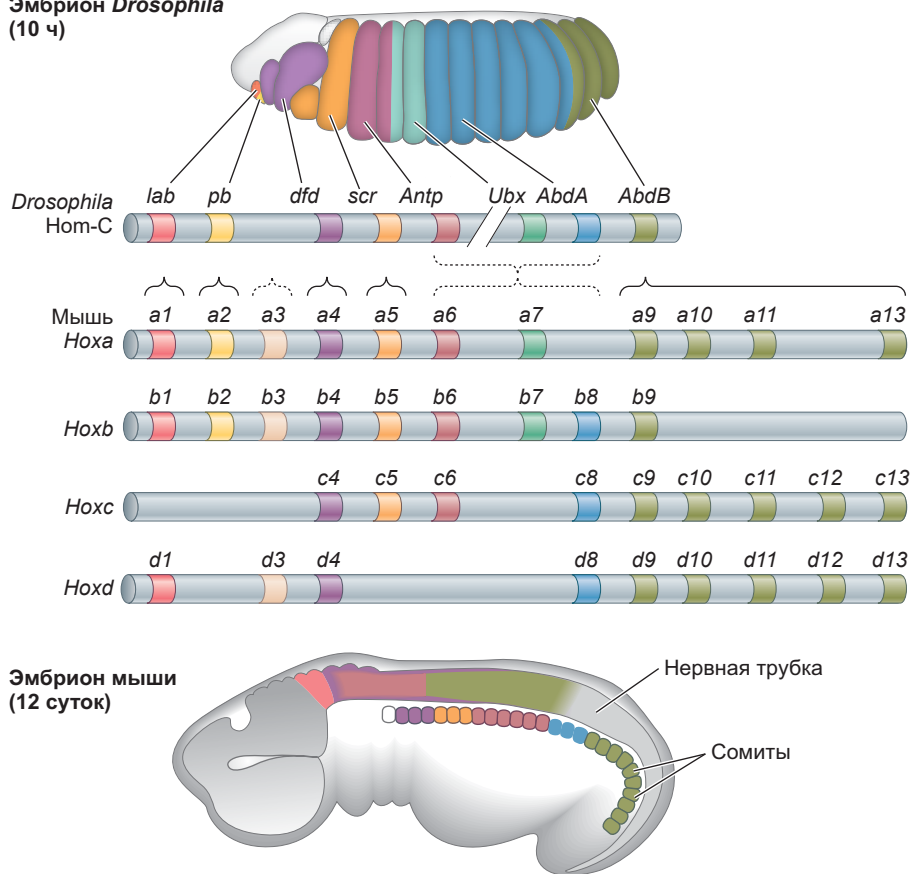
Эмбрион *Drosophila*
(10 ч)

Рис. 12.20. Эволюционную консервативность организации и экспрессии гомеозисных генов у плодовых мух и мышей подтверждает сходство кластера Ном-С на хромосоме 3 у *Drosophila* с четырьмя кластерами *Нох*-генов в геноме мыши. Гены со схожей структурой занимают одинаковое положение на каждой из четырех хромосом, а паралогичные группы демонстрируют схожие паттерны экспрессии. Гены мыши, относящиеся к группам с большими номерами, экспрессируются в развитии позже и ближе к заднему концу зародыша. Сравнение паттернов транскрипции генов Ном-С и *Нохb* плодовой мухи и мыши представлено на рисунках, располагающихся выше и ниже хромосом соответственно. (По данным: S. D. Huber et al., 2010. *PLOS ONE* 5 (5): e10820. doi: 10.1371/journal.pone.0010820; S. B. Carroll, 1995. *Nature* 376: 479–485.)

делах, чем *Нох*-гены, находящиеся ближе к 5'-концу (гомологи *Ubx*, *AbdA* и *AbdB*). Таким образом, ранее обнаруживаются гены паралогичной группы 4, экспрессирующиеся спереди от генов паралогичной группы 5 и т. д. (рис. 12.20; Wilkinson et al., 1989; Keynes and Lumsden, 1990). Исследования мутаций в *Нох*-генах позволяют предположить, что региональную идентичность вдоль передне-задней оси преимущественно определяет тот ген, который экспрессируется наиболее постериорно в данной области.

Сравнительная анатомия и экспрессия *Нох*-генов. Новый тип сравнительной эмбриологии основан на сравнении паттернов экспрессии генов, ответственных за проявление характеристик разных видов. Гант (Gaunt) (1994) и Берк (Burke) с соавторами (1995) сравнили позвонки мыши и цыпленка (рис. 12.21А). Хотя число позвонков у этих животных не различается, распределены они по-разному. У мыши, как у других млекопитающих, будь то жирафы или киты, всего 7 шейных позвонков. За ними следуют 13 грудных, 6 поясничных, 4 крестцовых и переменное (20+) число хвостовых позвонков. У цыпленка же 14 шейных позвонков, 7 грудных, 12 или 13 (в зависимости от породы) пояснично-крестцовых и 5 копчиковых (слитых хвостовых) позвонков. Исследователи задались вопросом: есть ли корреляция между экспрессией *Нох*-генов и типом сформированного позвонка (например, шейный или

грудной) или с положением позвонка (например, будет он 8 или 9)?

Ответ состоит в том, что совокупность экспрессии *Нох*-генов определяет тип формирующегося позвонка. У мыши переход между шейным и грудным отделом находится на границе 7-го и 8-го позвонков, а у цыплят — между 14-м и 15-м (рис. 12.21Б). В обоих случаях паралоги *Нох5* экспрессируются в последнем шейном позвонке, в то время как передняя граница паралогов *Нох6* простирается до первого грудного позвонка. Аналогично, у обоих видов животных торакально-поясничный переход имеет место на границе экспрессии паралогов *Нох9* и *Нох10*. Повидимому, существует код различной экспрессии *Нох*-генов вдоль передне-задней оси, и согласно этому коду определяется тип позвонка.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ГОМЕОЗИСНЫЕ ТРАНСФОРМАЦИИ У МЫШЕЙ

Как было сказано выше, у мышей всегда определенное число и расположение позвонков, а экспрессия *Нох*-генов управляет типом формирующегося позвонка (рис. 12.22А). Это было показано в экспериментах: когда все шесть копий паралогичной группы *Нох10* (например, *Нохa10*, *Нохc10* и *Нохd10* на рис. 12.23) были выключены (нокау-

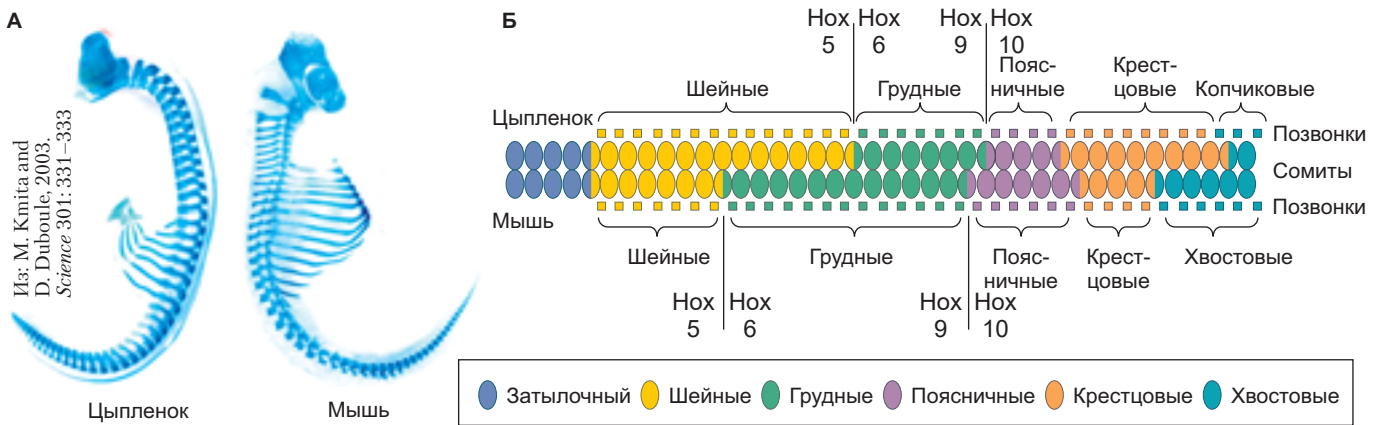
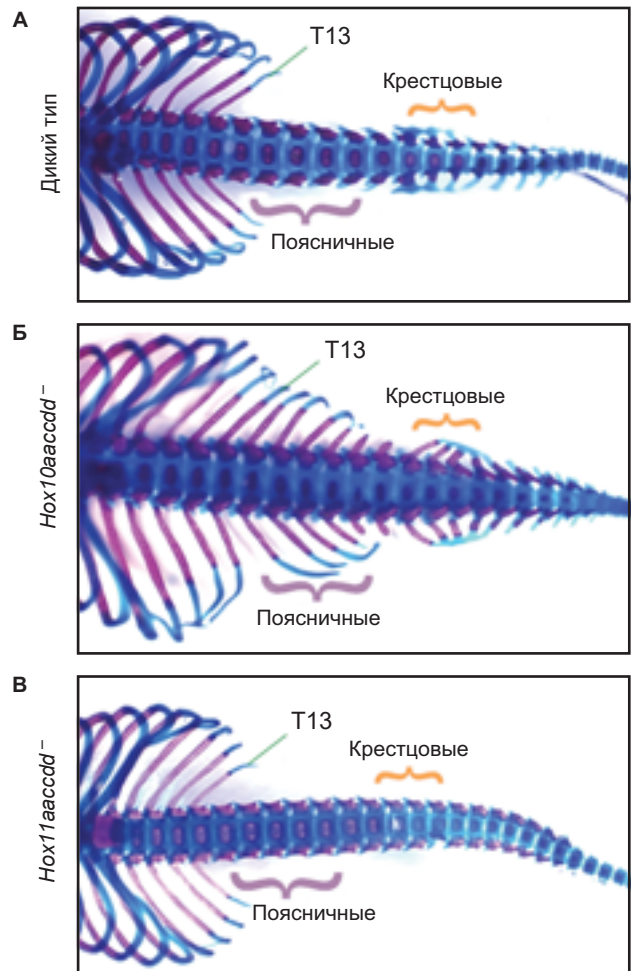


Рис. 12.21. Схематичное изображение позвоночника цыпленка и мыши вдоль передне-задней оси. **А.** Осевой скелет цыпленка и мыши, окрашенный альциановым синим, на сопоставимых стадиях развития. У цыпленка в два раза больше шейных позвонков, чем у мыши. **Б.** Границы экспрессии паралогичных групп *Hox*-генов (*Hox 5/6* и *Hox 9/10*) сопоставлены с типом формирующихся позвонков. (Рис. Б по данным: A. C. Burke et al., 1995. *Development* 121: 333–346.)

тированы), поясничные позвонки не развивались. Вместо этого презумптивные поясничные позвонки развились как грудные, т. е. образовали ребра и другие соответствующие характерные черты (рис. 12.22Б). Такая гомеозисная трансформация сравнима с тем, что происходит у насекомых. Тем не менее избыточность генов у мышей усложняет данный процесс, так как существование даже одной копии генов группы *Hox10* препятствовало трансформации (Wellik and Capecchi, 2003; Wellik, 2009). Точно так же при нокаутировании шести копий *Hox11* грудные и поясничные позвонки формировались нормально, а крестцовые не образовывались или происходила их замена на поясничные (рис. 12.22В). В недавно приведенных экспериментах ген *Hoxb6*, под контролем энхансера Delta, начинал экспрессироваться в каждом сомите. В результате была получена «змеевидная» мышь, у которой из каждого сомита сформировался несущий ребро грудной позвонок (см. рис. 17.7В; Guerreiro et al., 2013).

Рис. 12.22. Осевой скелет мыши, эксперименты по нокауту генов. На каждой фотографии изображен эмбрион мыши на стадии 18,5 суток развития, вид сверху на вентральную сторону от середины грудной клетки до хвоста. **А.** Мышь дикого типа. **Б.** Полный нокаут паралогов *Hox10* (*Hox10aacdd*) приводит к превращению поясничных позвонков (после 13-го грудного позвонка) в грудные позвонки, несущие ребра. **В.** Полный нокаут паралогов *Hox11* (*Hox11aacdd*) приводит к превращению крестцовых позвонков в поясничные

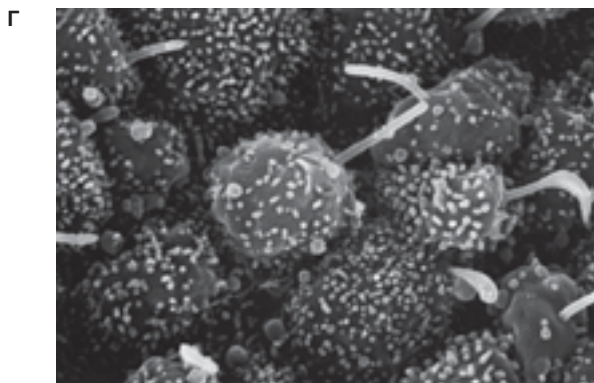
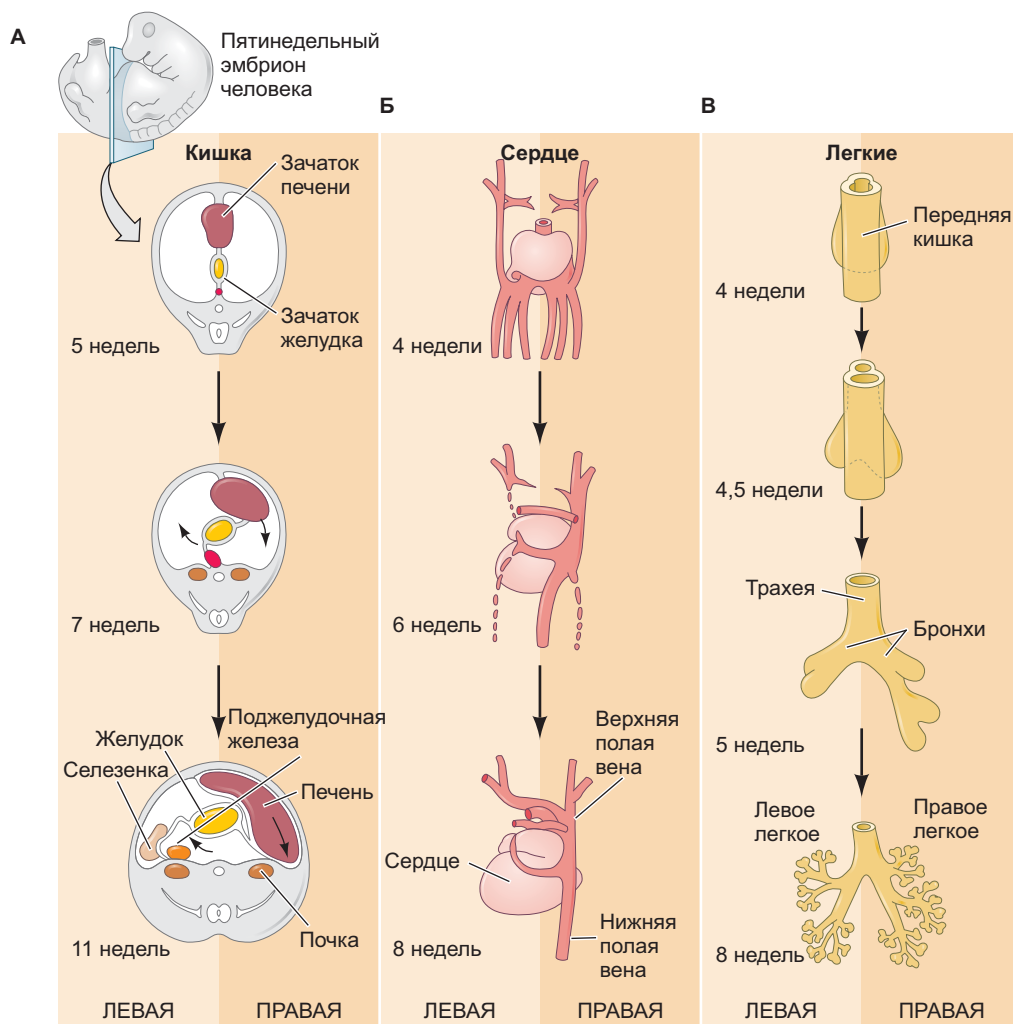


По данным: D. M. Wellik and M. R. Capecchi, 2003. *Science* 301: 363–367, с разрешения М. Capecchi

ЛЕВО-ПРАВЯЯ ОСЬ

Внутренние органы млекопитающих расположены асимметрично, что подтверждается положением селезенки, печени и сердца в левой или правой половине тела (**рис. 12.23А–В**). Как и у эмбриона курицы, у млекопитающих установление лево-правой оси, по-видимому, обусловлено активацией

белка Nodal и транскрипционного фактора Pitx2 в левой части мезодермы боковой пластинки (латеральной мезодермы), в то время как Cerebrus, ингибирующий Nodal, присутствует справа (см. рис. 12.9; Collignon et al., 1996; Lowe et al., 1996; Meno et al., 1996). Тем не менее у каждой группы амниот могут быть реализованы различные пути определения этой оси (Vanderberg and Levin,



Из: K. Sulik et al., 1994.
Dev Dyn 201: 260–278, с разрешения
K. Sulik and G. C. Schoenwolf

Рис. 12.23. Развитие лево-правой асимметрии у человека. **А.** Поперечный срез туловищного отдела показывает, что изначально симметрично расположенные зачатки органов к 11-й неделе развития занимают асимметричное положение. Печень смещается на правую сторону, а селезенка — на левую. **Б.** Не только сердце перемещается на левую сторону тела, но и изначально симметричные вены подвергаются регрессии таким образом, что оказываются связанными только с правой стороной сердца, превращаясь в верхние и нижние полые вены. **В.** Правое легкое состоит из трех долей, в то время как левое (расположенное около сердца) — только из двух. (У мужчин мошонка тоже формируется асимметрично.) **Г.** Ресничные клетки в составе узелка. Каждая клетка имеет только одну ресничку, располагающуюся на задней вентральной области клетки. (Рис. А–В по данным: K. Kosaki and B. Casey, 1998. Semin Cell Dev 9: 89–99.)

2013). У млекопитающих возникновение различий между левой и правой сторонами тела связано с ресничными клетками в узелке (рис. 12.23Г). Биение ресничек направляет ток жидкости в узелке справа налево (по часовой стрелке, если смотреть с вентральной стороны). Когда Нонака (Nonaka) с коллегами (1998) нокаутировали у мыши ген, кодирующий моторный белок динеин (см. гл. 7), реснички в узелке стали неподвижными. Это привело к тому, что асимметричные органы располагались случайным образом слева или справа. (Данные эксперименты позволили объяснить клинические случаи, когда у пациентов с дефицитом динеина и, следовательно, неподвижными ресничками сердце случайным образом располагалось справа или слева; Afzelius, 1976). Более того, когда та же группа ученых в 2002 г. провела эксперименты по культивированию ранних эмбрионов мыши в условиях искусственно созданного тока жидкости слева направо, были получены эмбрионы с инвертированной лево-правой осью.

Создание направленного тока жидкости, по-видимому, обусловлено тем, что каждая из 200 или около того клеток в составе узелка содержит базальное тело реснички, располагающееся на постериорной стороне каждой ресничной клетки, а ресничка выходит за вентральную поверхность (см. рис. 12.23Г).

Таким образом, расположение ресничек объединяет информацию, касающуюся передне-задней и дорсально-вентральной осей, для определения лево-правой оси (Guirao et al., 2010; Hashimoto et al., 2010). Положение ресничек определяется планарной клеточной полярностью (PCP) — сигнальным путем, который, в свою очередь, может управляться сигнальным путем Wnt. Мутации в сигнальных молекулах PCP-пути могут приводить к случайному расположению ресничек на клетках узелка, следовательно, вызывать нарушения в формировании лево-правой оси.

Но каким образом биение ресничек участвует в определении оси тела? Судя по всему, клетки, располагающиеся по соседству с узелком, или клетки короны (crown cells), чувствительны к направлению потока жидкости. Эти клетки тоже имеют реснички, которые неподвижны, но ток жидкости активирует белок Pkd2 в них. Каскад, запускаемый Pkd2 (каким именно образом, пока не известно), по-видимому, подавляет синтез Cerebrus, тем самым активируя Nodal (Kawasumi et al., 2011; Yoshida et al., 2012). Считается, что Nodal аутокринно связывается с клетками, окружающими узелок, усиливая собственную транскрипцию, в то время как Cerebrus (синтезируемый на правой стороне) будет ингибировать экспрессию Nodal. Таким образом, экспрессия Nodal поддерживается только на левой стороне, где он может активировать Pitx2, который определяет лево-правую асимметрию.

Близнецы

На ранних стадиях развития одни клетки в составе эмбрионов млекопитающих способны легко заменять друг друга и компенсировать отсутствие других. Эту способность к регуляции впервые показал в 1952 г. в экспериментах Зайдель (Seidel), когда разрушил один из двух бластомеров в эмбрионе кролика, а из оставшегося развился нормальный эмбрион. Регуляторные способности раннего эмбриона можно наблюдать и у людей. У человека близнецы могут быть разделены на две основные группы: гомозиготные (монозиготные) (развивающиеся из одной яйцеклетки; идентичные, однояйцевые) и гетерозиготные (развивающиеся из разных яйцеклеток, двойняшки, разнаяйцевые). Гетерозиготные близнецы развиваются в результате оплодотворения двух разных яйцеклеток, в то время как гомозиготные близнецы образуются из одной оплодотворенной яйцеклетки, по мере развития которой происходит разобщение клеток в составе эмбриона.

Идентичные близнецы, частота появления которых составляет один случай на 400 родов, могут образовываться в результате деления бластомеров ранних эмбрионов или даже путем деления ВКМ на две в пределах одной и той же бластоцисты. Наличие у 33% гомозиготных близнецов двух отдельных хорионов указывает на то, что деление произошло до пятых суток развития, когда происходит формирование трофобласта (рис. 12.24А). В том случае, когда у идентичных близнецов образуется общий хорион, можно говорить о том, что имело место деление ВКМ после обособления от трофобласта. К девятым суткам развития эмбрион человека завершает образование еще одной внезародышевой оболочки — амниона. Если деление ВКМ произошло между пятыми и девятыми сутками, то у эмбрионов образуется общий хорион и два отдельных амниона (рис. 12.24Б). Такая ситуация имеет место в двух из трех случаев развития гомозиготных близнецов. В небольшом числе случаев близнецы имеют как общий амнион, так и общий хорион (рис. 12.24В), следовательно, деление клеточного материала у них произошло после 12 суток развития.

Согласно исследованиям близнецов, каждая клетка в составе ВКМ должна быть способна дифференцироваться в любую клетку тела. Данная гипотеза получила подтверждение и имеет важные последствия для изучения развития млекопитающих. При выделении клеток ВКМ и выращивании их в подходящих условиях они остаются в недифференцированном состоянии и продолжают делиться в культуре (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Это эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). При введении ЭСК в бластоцисту мыши они способны встраиваться в ВКМ реципиента. В результате образуется эмбрион, состоящий из клеток как реципиента, так

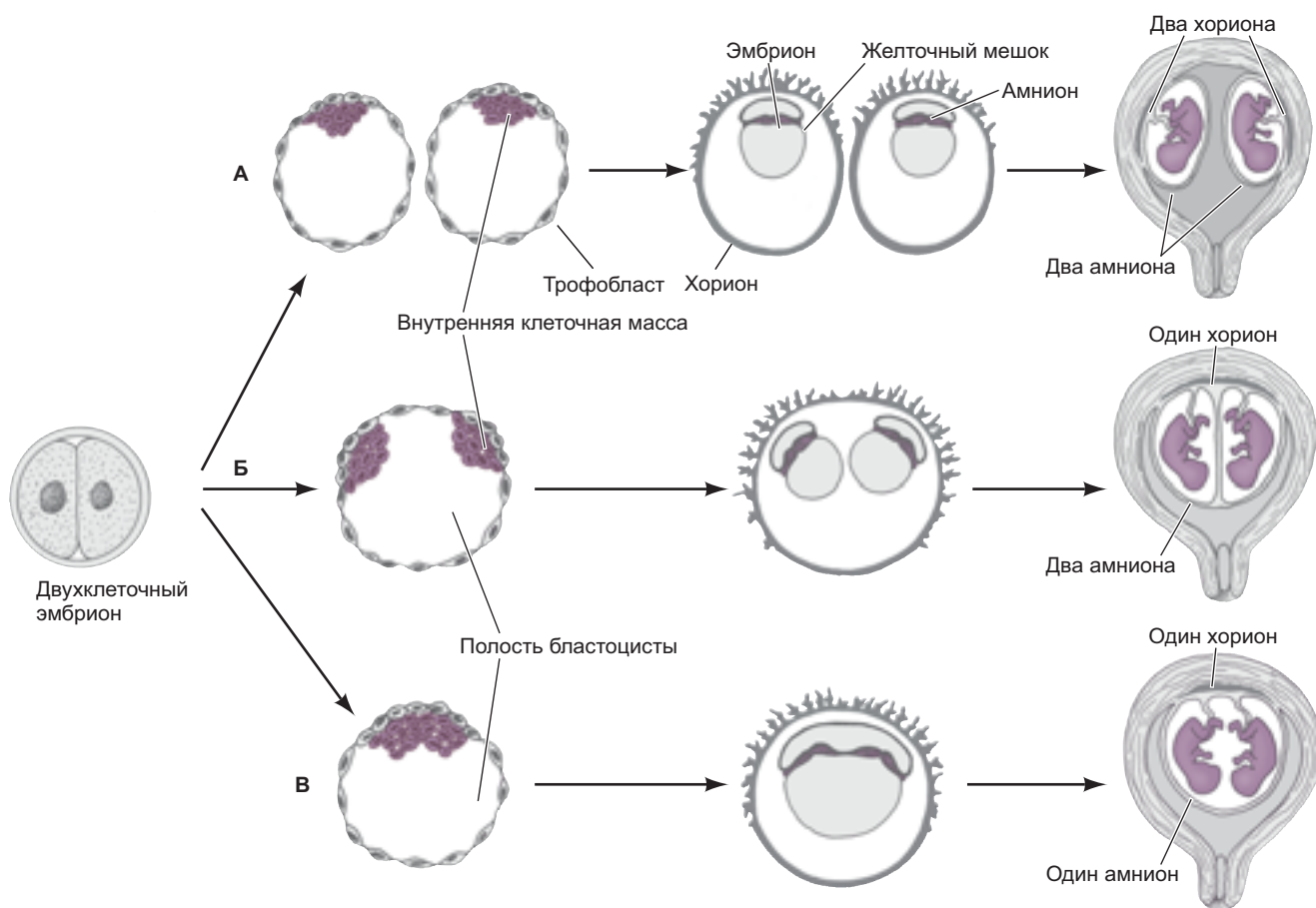


Рис. 12.24. Образование внезародышевых оболочек и время формирования гомозиготных близнецов у человека. **А.** Разделение бластомеров происходит до образования трофобласта, поэтому у каждого из зародышей формируются собственные хорион и амнион. **Б.** Имеет место разделение ВКМ после образования трофобласта, но до образования амниона, в результате у развивающихся близнецов формируются отдельные амнионы, но общий хорион. **В.** Если разделение клеток происходит после образования амниона, то эмбрионы развиваются внутри общего амниона. (По данным: T. W. Sadler, 2018. *Langman's Medical Embryology*. Wolters Kluwer Health: Philadelphia.)

и введенных клеток. Данный метод стал чрезвычайно важным при определении функции генов во время развития млекопитающих.

В то время как двойцевые близнецы образуются в процессе оплодотворения (две отдельные яйцеклетки оплодотворены двумя сперматозоидами), а гомозиготные близнецы образуются во время дробления, сиамские близнецы, вероятно, образуются во время гаструляции. Сиамские близнецы чаще всего гомозиготны (существует несколько зарегистрированных случаев сиамских близнецов разного пола; Martínez-Frías, 2009) и встречаются примерно в одном случае на каждые 200 000 родов. Шпратт (Spratt) и Хаас (Haas) (1960) показали, что если разделить эпибласт цыпленка на четыре части, то в каждой будет формироваться первичная полоска (рис. 12.25А). Кроме того, если в эпибласт пересадить второй Гензеновский узелок, то две первичные полоски могут слиться в одну.

Похоже, что, если в краевой (маргинальной) зоне возникает разрыв (позволяющий сформироваться дополнительному центру экспрессии *Nodal*) или если в другой части краевой зоны возникает центр экспрессии *Nodal*, может сформироваться дополнительная ось (рис. 12.25Б; Bertocchini and Stern, 2002; Perea-Gomez et al., 2002; Torlopp et al., 2014). Поскольку считается, что у человека при образовании первичной полоски работает такой же сигнальный каскад, как и у птиц, весьма вероятно, что возникновение гомозиготных близнецов может быть обусловлено возникновением двух областей, экспрессирующих *Nodal*, в краевой зоне. Такой подход может объяснить существование различных типов сиамских близнецов (Levin, 1999) (рис. 12.25В). Хотя точно не известно, как именно образуются сиамские близнецы, возникновение множества осей во время гаструляции вполне может объяснить данный феномен.

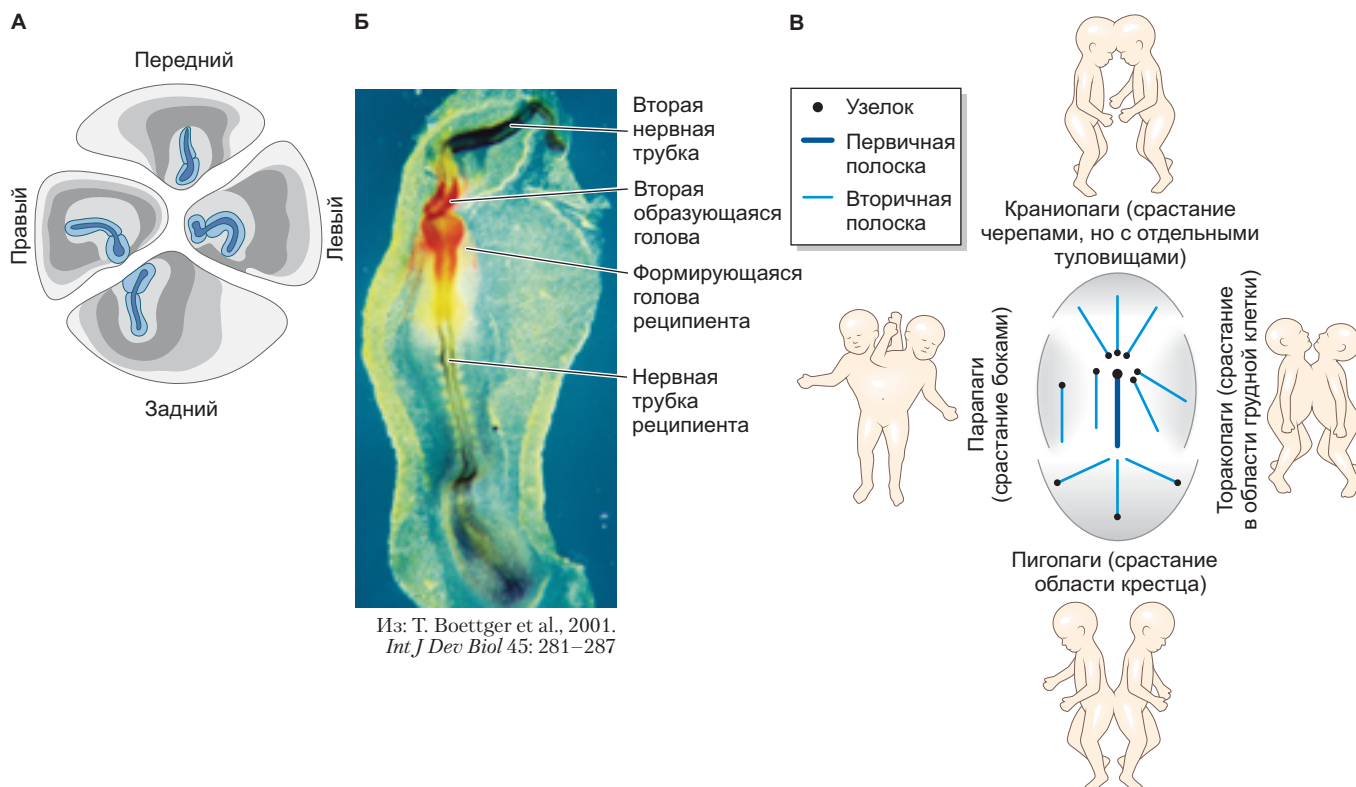


Рис. 12.25. А. Шпратт (Spratt) и Хаас (Haas) в 1960 г. показали, что при разделении эципленька на четыре части каждая часть образовывала собственную первичную полосу. Б. Если поместить второй Гензеновский узелок в эципленька, то две первичные полосы могут слиться в одну. Предполагается, что в случае разрыва или появления второго очага экспрессии *Nodal* в задней краевой (маргинальной) зоне возможно образование второй оси. В. В связи с тем что у человека при образовании первичной полосы работает тот же сигнальный путь, что и у птиц, siamoisские близнецы могут развиваться из-за возникновения двух очагов экспрессии *Nodal* в краевой зоне. Этот факт объясняет существование различных типов siamoisских близнецов (Рис. А по данным: N. T. Spratt Jr. and H. Haas, 1960. *J Exp Zool* 145: 97–138; рис. В по данным: L. B. Arey, 1947. *Developmental Anatomy*, p. 172. Saunders: Philadelphia; R. Spencer, 1992. *Teratology* 45: 591–602.)



Загадки развития

В эпизоде американского сериала «CSI: Исследование места преступления» ДНК очевидного преступника не совпадала с ДНК клеток, обнаруженных на месте преступления. Эпизод был основан на реальном, но крайне редко встречающемся случае, когда у млекопитающего было обнаружено два различных набора ДНК. Как вы думаете, как такая ситуация могла возникнуть?

Послесловие

Вариации в важнейших процессах развития возникали в различных группах позвоночных животных (рис. 12.26). Главные события гаструляции позвоночных включают:

- интернализацию (подворачивание) мезодермы и энтодермы;

- эпиболию эктодермы вокруг эмбриона;
- конвергентное схождение клеток внутренних слоев к средней линии;
- удлинение тела вдоль передне-задней оси.

Хотя для эмбрионов рыб, амфибий, птиц и млекопитающих характерны различные типы дробления и гаструляции, они используют в основном одни и те же молекулы для управления этими процессами и достижения конечного результата. Так, у всех групп животных установление передне-задней полярности реализуется благодаря градиенту белков *Nodal* и *Wnt*. У *Xenopus* и *Danio rerio* за активацию *Nodal* в вегетативном полушарии или краевой зоне отвечают материнские факторы. У эципленька экспрессию *Nodal* индуцируют *Wnt* и *Vg1*, выделяемые клетками задней краевой (маргинальной) зоны, а в остальных областях активность *Nodal* подавляют клетки гипобласта. У мышей активность *Nodal* также ограничивают клетки гипобласта, но в отличие от птиц, у которых антагонистом *Nodal* служит только *Cerebrus*, у мышей задействован еще и *Lefty1*.

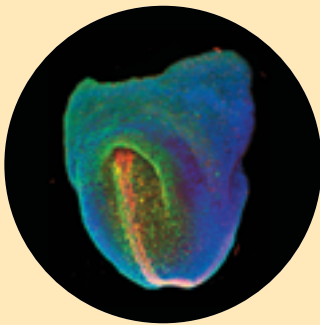
СТАДИЯ	Рыба <i>Danio rerio</i>	Лягушка <i>Xenopus laevis</i>	Курица <i>Gallus gallus</i>	Мышь <i>Mus musculus</i>
Раннее дробление				
Позднее дробление				
Ранняя гастрולה				
Поздняя гастрולה				
Фарингула				

Из: L. Solnica-Krezel, 2005. *Curr Biol* 15: R213–R228

Рис. 12.26. Раннее развитие четырех видов позвоночных животных. Тип дробления существенно различается. У *Danio rerio* и цыпленка дробление меробластическое дискоидальное, у лягушек — неравномерное голобластическое, а у млекопитающих — равномерное голобластическое дробление. В результате дробления образуются бластулы, сильно различающиеся, но с общими чертами, например центром Ньюкупа (NC, *зеленый круг*). В начале гастрюляции у всех зародышей выделяются клетки, эквивалентные Шлемановскому организатору (организатору Шлемана–Мангольдт, SMO; *красные круги*). SMO обозначает ту область зародыша, где начнут формироваться бластопор, части бластопора, формирующиеся позже (*красные стрелки*, идущие от организатора). На стадии поздней гастрюлы энтодерма (*желтая*) находится внутри зародыша, эктодерма (*синяя, фиолетовая*) покрывает эмбрион снаружи, а мезодерма (*красная*) располагается между ними. На данной стадии регионализация мезодермы уже началась. *Нижний ряд*: стадия фарингулы, следующая за гастрюляцией. Она характерна для позвоночных, к этому времени уже сформированы глотка, нервная трубка, хорда, сомиты и чувствительная передняя (головная) область

Для определения дорсальной стороны каждая из групп позвоночных животных использует ингибиторы BMP. Аналогично ингибирование экспрессии Wnt и Otx2 играет важную роль при определении передних отделов эмбриона, но в то же время различные группы клеток способны синтезировать эти белки. Во всех случаях разметку тела от заднего мозга до хвоста осуществляют *Нох*-гены. Наконец, установление лево-правой асимметрии происходит

посредством экспрессии Nodal в левой половине эмбриона, где он активирует Pitx2, что и приводит к возникновению различий между правой и левой сторонами эмбриона. Факторы, вызывающие экспрессию Nodal слева, разнятся между группами позвоночных животных. Несмотря на существующие различия в характере дробления и гаструляции, механизмы определения осей тела у разных позвоночных животных очень схожи.



С разрешения: I. Costello
и E. Robertson

О фотографии в начале главы

На фотографии представлена первичная полоска и энтодерма головы 7,5-суточного эмбриона мыши, т. е. показаны начальные этапы спецификации переднего отдела. На одной фотографии представлено множество сигнальных систем, которые участвуют в определении правильного положения головных и хвостовых структур. Ядра всех клеток окрашены в синий цвет. Транскрипционные факторы Lhx1, Foxa2 (*зеленый*) и Otx2 вступают во взаимодействие и вызывают дифференцировку головной мезодермы. Brachyury (*красный*) маркирует центральную мезодерму. Foxa2 и Brachyury коэкспрессированы (*желтый*) в передних структурах и узелке. Паттерны экспрессии этих факторов регулируют белки Nodal и Wnt, что приводит к определению тех областей зародыша, из которых будут сформированы передние (головные) и задние (хвостовые) структуры тела млекопитающего.

12

Коротко Птицы и млекопитающие

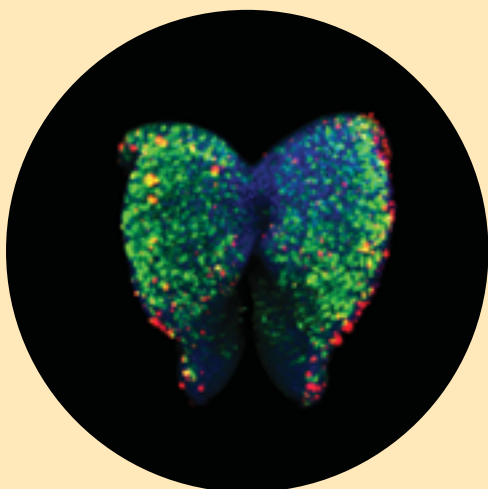
1. Для рептилий и птиц, так же как и для рыб, характерно дискоидальное меробластическое дробление, при котором ранние клеточные деления борозды деления дробления не разделяют яйцеклетку (желток) полностью. Эти ранние клетки формируют бластодерму.
2. У эмбрионов птиц во время ранних этапов дробления происходит формирование двух зон: *area pellucida* и *area opaca*. Область между ними — краевая зона. Гаструляция начинается в области *area pellucida* рядом с задней краевой зоной, так как там образуются гипобласт и первичная полоска.
3. Первичная полоска формируется из клеток эпибласта и центральных клеток серпа Коллера. По мере удлинения первичной полоски в переднем (ростральном) направлении на ее конце начинает образовываться Гензеновский узелок. Клетки, высекающиеся из области Гензеновского узелка, становятся прехордальной мезодермой и следуют до прехордальной пластинки.
4. Прехордальная пластинка участвует в индукции формирования переднего мозга, хордамезодерма индуцирует формирование среднего мозга, заднего мозга и спинного мозга. Первые клетки, мигрировавшие через первичную полоску, становятся энтодермой, замещающей гипобласт. Вслед за ними мигрируют клетки мезодермы, в то время как поверхностная эктодерма обрастает желток, т. е. происходит эпиболия.
5. У птиц в определении места начала формирования первичной полоски, а следовательно, и в установлении передне-задней и дорсально-вентральной осей тела важную роль играет гравитация. Лево-правая ось устанавливается благодаря синтезу белка Nodal только на левой стороне тела зародыша, что служит сигналом к экспрессии Pitx2 на левой стороне развивающихся органов.
6. Гипобласт тоже принимает участие в формировании осей тела зародыша, так как миграция его клеток определяет движение клеток, формирующих первичную полоску и ее ориентацию.
7. Для млекопитающих характерно голобластическое дробление, а точнее, такая его разновидность, как ротационное дробление. Особенности данного типа дробления — низкая скорость клеточных делений, уникальная ориентация плоскостей деления дробления, асинхронность делений и формирование бластоцисты.
8. Бластоциста образуется после того, как эмбрион проходит стадию компактизации. В составе

бластоцисты различают две популяции клеток: наружный слой — трофобласт, который в дальнейшем будет образовывать хорион, и ВКМ, клетки которой будут принимать участие в построении всех тканей и органов зародыша, а также формировать амнион.

9. Клетки ВКМ плюрипотентны, их можно культивировать как эмбриональные стволовые клетки. Из ВКМ образуется эпибласт и висцеральная энтодерма (гипобласт).
10. Хорион образует плодную часть плаценты, основная функция которой — обеспечение эмбриона кислородом и питательными веществами, кроме того, этот орган выделяет гормоны, поддерживающие беременность, а также предотвращает развитие иммунной реакции в организме матери в ответ на присутствие развивающегося плода.
11. Гастрюляция млекопитающих не отличается от гастрюляции птиц. Вероятно, у млекопитающих формируется сразу два сигнальных центра — в области узелка и в области передней (антериорной) висцеральной энтодермы. Последний играет решающую роль при определении осей тела зародыша, в то время как первый необходим для индукции развития нервной системы и дифференцировки осевых структур, расположенных каудальнее среднего мозга.
12. *Нох*-гены участвуют в образовании и разметке передне-задней оси тела. При нокауте (выключении) *Нох*-генов могут возникать различные пороки развития, специфичные для конкретного отдела. Если вызвать эктопическую экспрессию *Нох*-генов, можно изменить оси тела.
13. Гомология структуры и сходство паттернов экспрессии *Нох*-генов *Drosophila* и млекопитающих позволяют предположить, что этот механизм разметки тела чрезвычайно древний.
14. Установление лево-правой оси у млекопитающих происходит аналогично установлению этой оси у птиц, но с некоторыми существенными различиями в роли определенных генов.
15. При гастрюляции амниот плюрипотентный эпителий, или эпибласт, дает начало мезодерме и энтодерме, которые мигрируют через первичную полосу, а также предшественникам эктодермы, остающимся на поверхности. К окончанию гастрюляции голова и передние части тела уже сформированы. Однако в каудальном отделе продолжается удлинение эмбриона за счет клеток эпибласта, окружающих смещающийся назад Гензеновский узелок.
16. У представителей всех классов позвоночных животных нейроэктодерма может развиваться там, где заблокирована ВМР-опосредованная индукция развития покровной эктодермы.
17. Разнояйцевые (гетерозиготные) близнецы развиваются при оплодотворении двух яйцеклеток. Однояйцевые (гомозиготные) близнецы появляются в результате деления эмбриона на две группы клеток на тех стадиях, когда в нем еще сохраняются плюрипотентные клетки. Данные экспериментов свидетельствуют о том, что сиамские близнецы могут возникать в результате формирования двух организмов в одном бластодиске.

Формирование и разметка нервной трубки

Что мешает
этому мозгу закрыться?

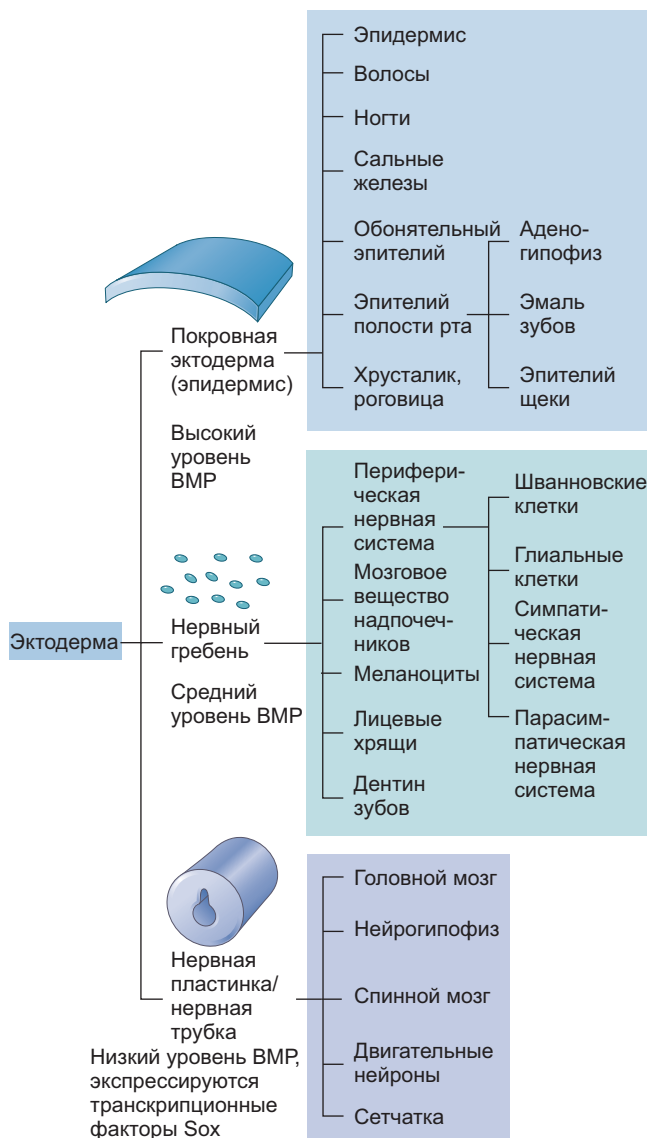
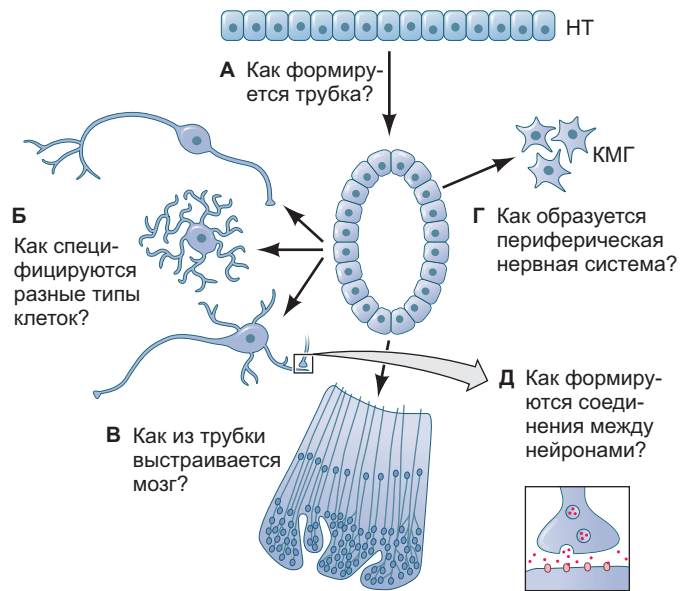


С разрешения: Lee Niswander и Huili Li

«Подобно энтомологу, ищущему ярко окрашенных бабочек, мое внимание приковано в саду серой материи, к клеткам тонких и элегантных форм, мистическим бабочкам души». Так Сантьяго Рамон-и-Кахаль, часто называемый отцом нейронауки, размышлял о своих исследованиях мозга. Его цитата 1937 г. мастерски передает очарование и тайну мозга — части большой системы, контролирующей коммуникацию, сознание, память, эмоции, движения, пищеварение, сенсорное восприятие и многое другое. Как развитие этого центрального органа скоординировано с развитием остального организма вплоть до интегрированной связи — останется одним из наиболее фундаментальных вопросов в биологии развития следующего века. Первое основное событие в развитии нервной системы — трансформация эпителиального пласта в трубку. Эта начальная структура послужит основой для регионализации и диверсификации структур мозга вдоль передне-задней оси; затем, благодаря стратегическим механизмам роста и дифференцировки клеток, можно создавать сложную и глубоко интегрированную **центральную нервную систему** (ЦНС) позвоночного. В последующих трех главах мы рассмотрим развитие нервной системы, начав здесь с формирования нервной трубки и спецификации клеток внутри ее (**рис. 13.1**). В гл. 14 мы погрузимся в механизмы, управляющие определением клеточных судеб и нейрогенезом вдоль дорсально-вентральной оси ЦНС. Затем, в гл. 15, мы обратимся к молекулярным механизмам, лежащим в основе формирования периферической нервной системы и развития линии нервного гребня.

Эктодерма позвоночных, наружный зародышевый листок со стадии поздней гаструлы, отвечает за формирование трех основных частей зародыша (**рис. 13.2**):

Рис. 13.1. Основные вопросы, рассмотренные в гл. 13, 14 и 15. Вопросы нейруляции и спецификации клеток (**А, Б**) будут освещены в этой главе. Как нервная трубка (НТ) преобразуется в сложные структуры мозга (**В**) — будет описано в гл. 14. В гл. 15 рассмотрим, каким образом периферическая нервная система (**Г**) в основном образуется из клеток нервного гребня (КНГ), мигрирующих из дорсальной части нервной трубки, и как вновь образованные нейроны удлиняют свои отростки, чтобы найти синаптических партнеров (**Д**) и таким образом объединить нервную систему в одно целое



1. Одна часть эктодермы под влиянием прехордальной пластинки и хорды в ходе гастрюляции станет **нервной пластинкой**, презумптивной нервной тканью. Нервная пластинка погружается в тело зародыша с формированием **нервной трубки**, предшественника ЦНС — головного и спинного мозга.
2. Другая часть наружного зародышевого листка станет **эпидермисом** — наружным слоем кожи, который представляет собой самый крупный орган в теле позвоночных. Эпидермис формирует эластичный, водостойкий и непрерывно регенерирующий барьер между организмом и внешним миром.
3. Между компартментами, образующими эпидермис и ЦНС, лежит презумптивный нервный гребень. Клетки нервного гребня отделяются от эпителиальных структур по средней линии на дорсальной стороне и мигрируют в стороны (между нервной трубкой и эпидермисом), чтобы дать начало **периферической нервной системе** (всем нервам и нейронам, лежащим за пределами ЦНС) и пигментным клеткам (например, меланоцитам), а также некоторым другим структурам.

Процесс, при котором три области эктодермы становятся физически и функционально отделенными друг от друга, называют нейруляцией, а эмбрион, подвергшийся этому процессу, носит название нейрулы (**рис. 13.3**; Gallera, 1971). Как мы видели

Рис. 13.2. Основные производные эктодермы. Эктодерма подразделяется на три основных домена: покровную эктодерму (главным образом эпидермис), нервный гребень (периферические нейроны, пигментные клетки, хрящи лица) и нервную трубку (головной и спинной мозг)

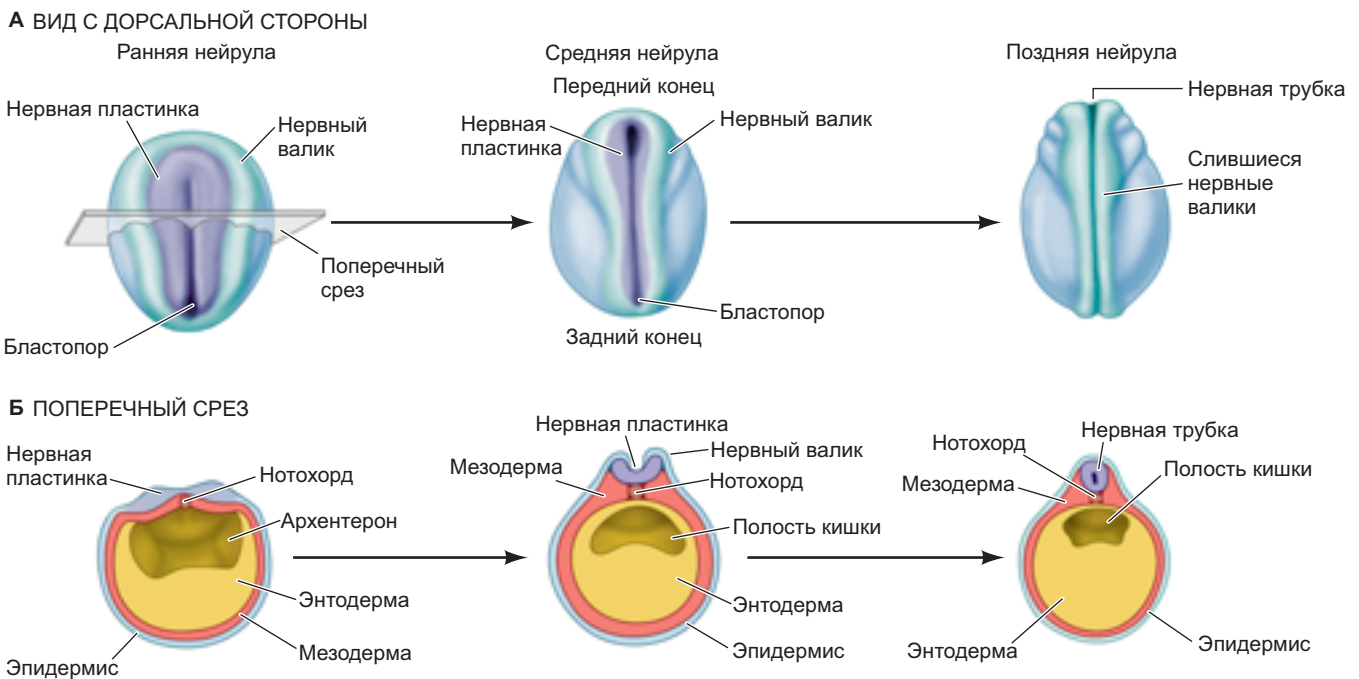


Рис. 13.3. Две схемы первичной нейруляции у эмбриона земноводного, показывающие раннюю (слева), среднюю (в середине) и позднюю (справа) нейрулу для каждого случая. **А.** Вид сверху на дорсальную поверхность целого зародыша. **Б.** Поперечный разрез через середину зародыша. (По данным: В. I. Balinsky, 1981. *Introduction to Embryology*, 5th Ed. Saunders: Philadelphia.)

в предыдущих главах, спецификация эктодермы обеспечивается во время гаструляции, главным образом за счет регуляции уровня ВМР, получаемого клетками. Высокий уровень ВМР инструктирует клетки становиться эпидермисом, очень низкий — превратиться в материал нервной пластинки. Средний уровень приводит к формированию клеток нервного гребня. Нейруляция следует непосредственно за гаструляцией.

Трансформация нервной пластинки в нервную трубку: рождение ЦНС

Для клеток нервной пластинки характерна экспрессия транскрипционных факторов семейства Sox (Sox1, Sox2 и Sox3). Эти факторы, во-первых, активируют гены, позволяющие клеткам стать нервной пластинкой, и во-вторых ингибируют формирование эпидермиса и нервного гребня путем блокирования транскрипции и сигнализации по ВМР-пути (Archer et al., 2011). На примере этих факторов мы снова сталкиваемся с важным принципом развития: часто одни и те же сигналы позволяют специфицироваться одним клеткам и при этом блокируют альтернативное направление развития клеток. Экспрессия транскрипционных факторов Sox определяет будущее клеток нервной пластинки в качестве

нейральных предшественников, которые могут формировать все клеточные типы в ЦНС (Wilson and Edlund, 2001).

Несмотря на то что нервная пластинка лежит на поверхности зародыша, нервная система во взрослом теле находится отнюдь не снаружи. По какой-то причине нервная пластинка погружается в зародыш и формирует нервную трубку. Этот процесс осуществляется путем нейруляции и имеет некоторые особенности у разных позвоночных (Harrington et al., 2009). Существует два принципиально различных типа нейруляции. При **первичной нейруляции** клетки, окружающие нервную пластинку, заставляют ее клетки пролиферировать, впячиваться внутрь тела и отделяться от покровной эктодермы с образованием под ней полой трубки. При вторичной нейруляции нервная трубка возникает из мезенхимных клеток, собирающихся в плотный тяж, последовательно формирующий полости, сливающиеся с образованием полой трубки. У многих позвоночных первичная и вторичная нейруляция разделены в пространстве таким образом, что путем первичной нейруляции формируется *передний* отдел нервной трубки, а ее *задний* отдел является результатом вторичной нейруляции (**рис. 13.4**).

У птиц путем первичной нейруляции образуется нервная трубка кпереди от задних конечностей (Pasteels, 1937; Catala et al., 1996). У млекопитающих вторичная нейруляция начинается на уровне крестцовых позвонков хвоста (Schoenwolf, 1984; Nievel-

stein et al., 1993). У рыб и амфибий (например, *Danio rerio* и *Xenopus*) нервная трубка развивается по механизму вторичной нейруляции только в хвостовом отделе (Gont et al., 1993; Lowery and Sive, 2004). Хордовые, занимающие более базальное эволюционное положение, такие как *Amphioxus* и *Ciona*, демонстрируют только механизмы первичной нейруляции, и предполагается, что первичная нейруляция была анцестральным механизмом, а вторичная во многом развивалась, как у конечностей, т. е. как новация позвоночных, в том числе в связи с удлинением хвоста (Handrigan, 2003).

Формирование нервной трубки завершается сливанием этих двух отдельно формирующихся трубок (Harrington et al., 2009). Размер **переходной зоны** между первичной и вторичной нервными трубками варьирует у разных видов: от относительно резко выраженной границы у мыши, до области, простирающейся вдоль грудных позвонков у курицы и грудного поясничного отдела у человека (Dady et al., 2014). Формирование нервной трубки в этой зоне называют **переходной нейруляцией** (Dady et al., 2014), так как оно происходит с участием механизмов, вовлеченных и в первичную, и во вторичную нейруляцию (см. рис. 13.4).

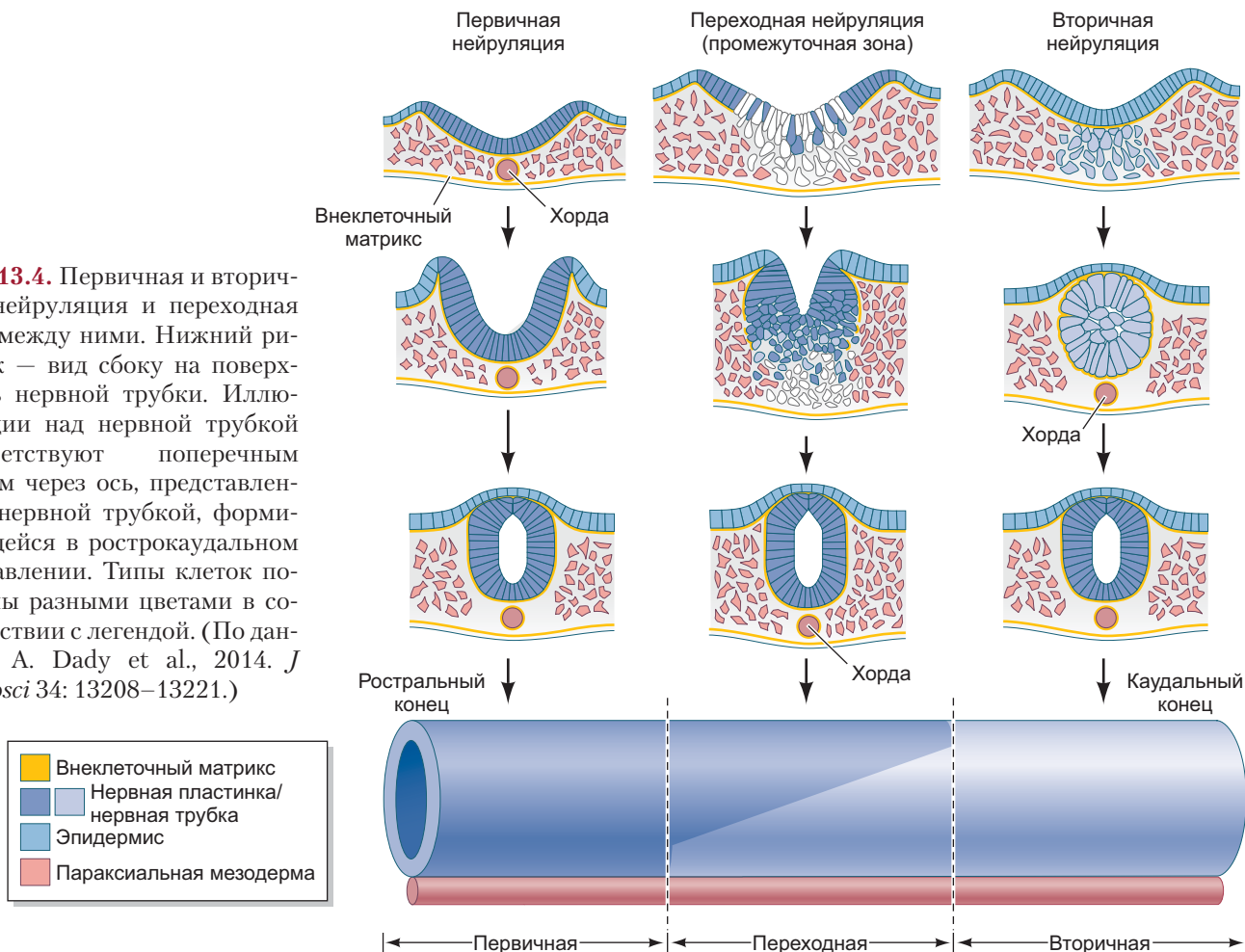
Первичная нейруляция

Процесс первичной нейруляции относительно сходен у всех позвоночных, хотя описан и ряд видоспецифичных особенностей. Мы в основном сфокусируемся на процессе первичной нейруляции у амниот при рассмотрении механизмов изгибания нервной пластинки. У курицы вскоре после формирования нервной пластинки ее края утолщаются и движутся вверх с формированием **нервных валиков**, а по центру пластинки образуется U-образный **нервный желобок**, разделяющий будущие левую и правую стороны зародыша (рис. 13.5). Нервные валики по бокам от нервной пластинки движутся к средней линии зародыша, в итоге сливаясь с образованием нервной трубки под покровной эктодермой.

Первичную нейруляцию можно разделить на четыре различных, но перекрывающихся во времени и пространстве стадии.

1. Удлинение и изгибание нервной пластинки. Клетки в ее составе делятся преимущественно в передне-заднем направлении (часто называемом **рострокаудальным**), что обеспечивает продолжающееся удлинение оси, сопряженное с гастрляцией. Эти события происходят, даже если ткань

Рис. 13.4. Первичная и вторичная нейруляция и переходная зона между ними. Нижний рисунок — вид сбоку на поверхность нервной трубки. Иллюстрации над нервной трубкой соответствуют поперечным срезам через ось, представленную нервной трубкой, формирующейся в рострокаудальном направлении. Типы клеток показаны разными цветами в соответствии с легендой. (По данным: A. Dady et al., 2014. *J Neurosci* 34: 13208–13221.)



нервной пластинки изолирована от остального зародыша. Однако для сворачивания в нервную трубку нужен также окружающий ее презумптивный эпидермис (рис. 13.6А, Б; Jacobson and Moury, 1995; Moury and Schoenwolf, 1995; Sausedo et al., 1997).

2. Изгибание нервной пластинки. Изгибание нервной пластинки происходит с формированием шарнирных районов, в которых она контактирует с окружающими тканями. У птиц и млекопитающих клетки, расположенные по средней линии нервной пластинки, формируют **медиальную шарнирную точку**, или МШТ (Schoenwolf, 1991a, b; Catala et al., 1996). Показано, что клетки МШТ



Загадки развития

Для чего нужны два различных механизма при построении нервной трубки? Что послужило давлением для отбора, вызвавшим появление вторичной нейруляции в качестве альтернативы распространению первичной нейруляции в задние отделы? При обдумывании ответов вспомните первый морфогенетический механизм зародыша, которым является гастрюляция. Повлияют ли на ваши идеи время окончания гастрюляции и возможность удлинения оси (или их отсутствие)? Удивительно, что мы до сих пор в полной мере не осознаем эволюционную историю нервной системы.

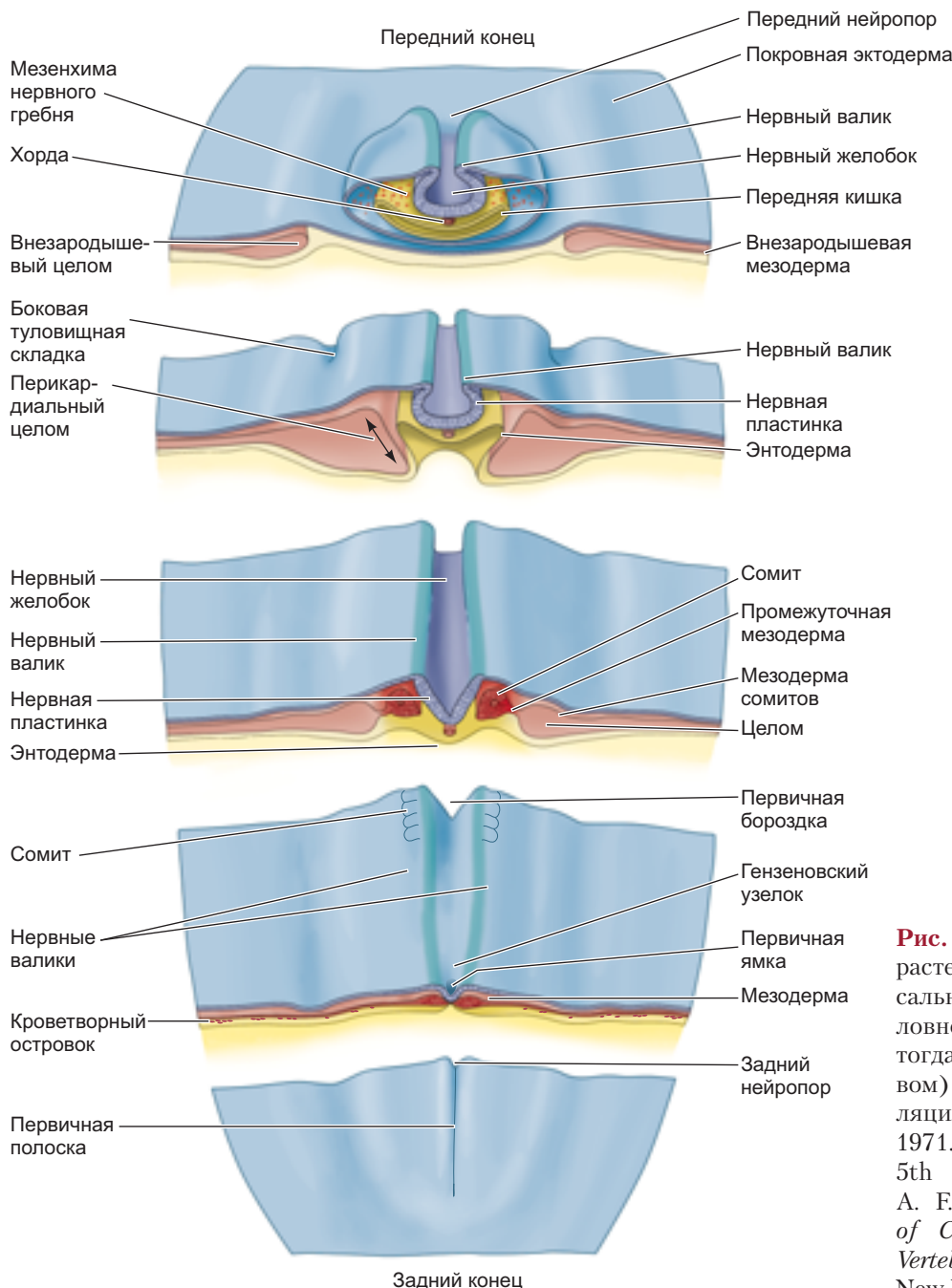


Рис. 13.5. Зародыш курицы в возрасте 24 ч в ходе нейруляции (дорсальный вид). В цефалическом (головном) отделе идет нейруляция, тогда как в каудальном (хвостовом) все еще происходит гастрюляция. (По данным: В. М. Patten, 1971. *Early Embryology of the Chick*, 5th Ed. McGraw-Hill: New York; A. F. Huettnner, 1943. *Fundamentals of Comparative Embryology of the Vertebrates*. The Macmillan Company: New York.)

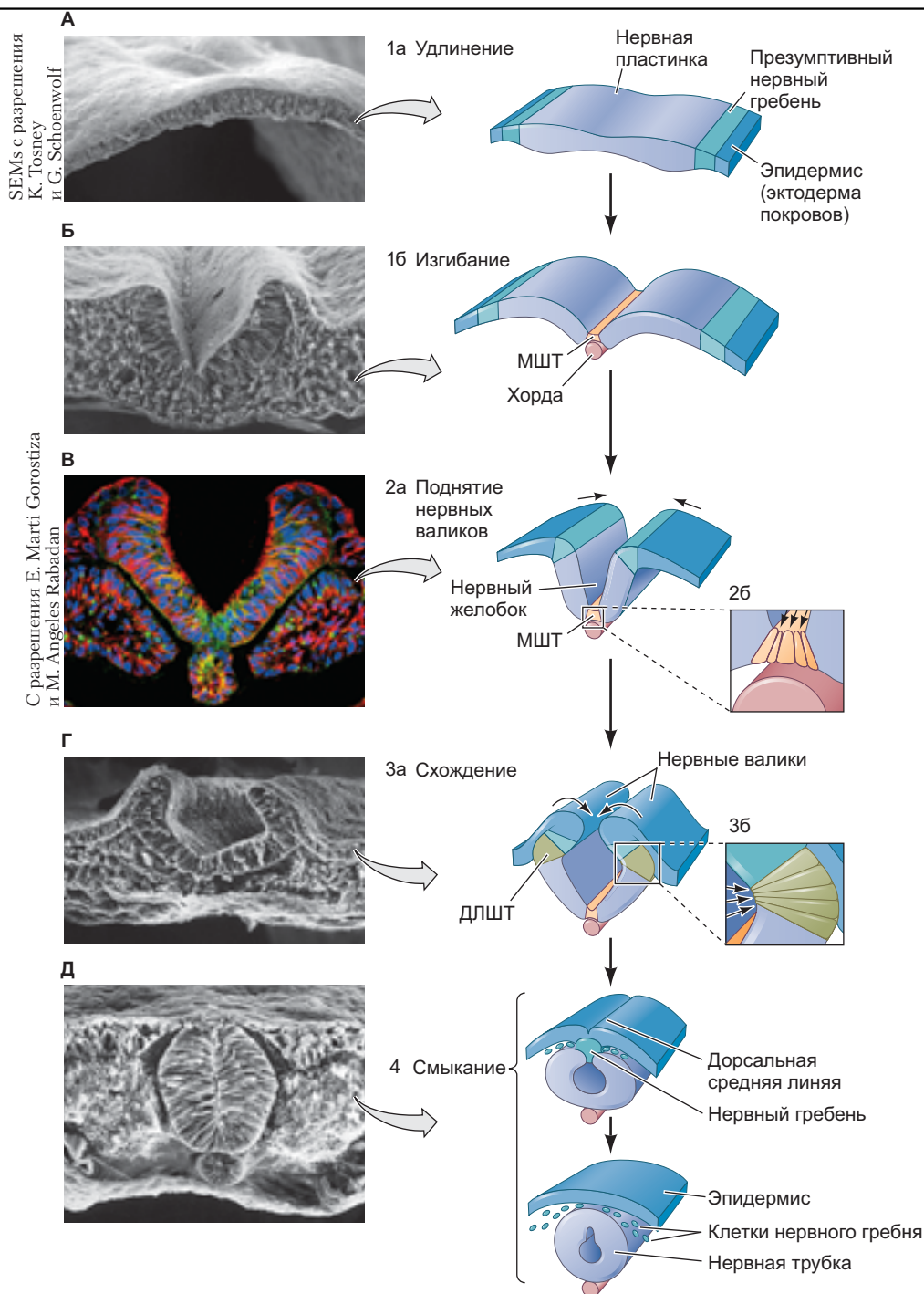


Рис. 13.6. Первичная нейруляция: формирование нервной трубки у куриного зародыша. **А, 1а.** Клетки нервной пластинки выделяются как удлинённые клетки в дорсальной области эктодермы. **Б, 1б.** Изгибание: клетки медиальной шарнирной точки (МШТ) закрываются на нотохорде и меняют форму, а презумптивные эпидермальные клетки движутся к дорсальной средней линии. **В, 2а.** Нервные валики поднимаются в силу того, что презумптивный эпидермис продолжает двигаться к дорсальной средней линии. Асимметричное сокращение актина в апикальных поверхностях клеток меняет их форму и способствует сгибанию в МШТ (**Б, В, 2б**). **В.** Поднятые нервные валики, окрашенные на компоненты внеклеточного матрикса (зелёный), и актиновый цитоскелет (красный), сконцентрированный в апикальных частях клеток нервной пластинки. **Г, 3а.** Схождение нервных валиков происходит по мере того, как клетки дорсально-латеральной шарнирной точки (ДЛШТ) приобретают клиновидную форму и эпидермальные клетки толкают их к центру. **Г, 3б.** Схожее апикальное сокращение происходит в ДЛШТ. **Д, 4.** Нервные валики вступают в контакт друг с другом. Клетки нервного гребня рассеиваются, выселяясь из нервной трубки, отделяющейся от эпидермиса. (По данным: J. L. Smith and G. C. Schoenwolf, 1997. *Trends Neurosci* 20: 510–517.)

прочно заякорены на хорде, расположенной под ними, и формируют шарнир, позволяющий образоваться на дорсальной средней линии бороздке, или **нервному желобку** (рис. 13.6В).

3. Схождение нервных валиков. Вскоре за изгибанием две дорсально-латеральные шарнирные точки (ДЛШТ) индуцируются покровной (эпидермальной) эктодермой и прикрепляются к ней. После начала образования бороздки на нейральной пластинке последняя изгибается вокруг шарнирных регионов. Каждый шарнир работает как ось, направляющая вращение клеток вокруг себя (Smith and Schoenwolf, 1991). Продолжающееся схождение покровной эктодермы к средней линии зародыша дает еще одну движущую силу для изгибания нервной пластинки, приводящего к сближению нервных валиков (рис. 13.6Г; Alvarez and Schoenwolf, 1992; Lawson et al., 2001). Это движение презумптивного эпидермиса вместе с заякориванием нервной пластинки на подлежащей мезодерме может выступать гарантией того, что нервная трубка инвагинирует и сложится внутрь зародыша, а не наружу (Schoenwolf, 1991a).
4. Смыкание нервной трубки. Нервная трубка смыкается по мере того, как нервные валики парно вступают в контакт друг с другом на дорсальной средней линии. Валики сливаются друг с другом, и клетки нейральной и поверхностной эктодермы с одной стороны соединяются с их соответствующими двойниками с противоположной стороны. В ходе слияния из апикальных поверхностей нервных валиков выселяются клетки, формирующие нервный гребень (рис. 13.6Д).

РЕГУЛЯЦИЯ ШАРНИРНЫХ ТОЧЕК

Складывание нервной пластинки подразумевает изгибание пласта эпителиальных клеток. Как может быть изогнут ряд кубических эпителиальных клеток? Это невозможно, пока форма их прямоугольная или кубическая (что характерно для эпителия); однако если площадь поверхности одной из сторон каждого кубика уменьшится относительно противоположной его поверхности (образуя форму усеченной пирамиды), каждая такая клетка будет вносить вклад в образование угла смещения относительно соседних клеток и приводить к изгибанию ряда кубиков. Медиальная шарнирная точка и две дорсально-латеральных шарнирных точки представляют собой три области нервной пластинки, где происходят такие изменения формы клеток (см. рис. 13.6Б–Г). Эпителиальные клетки в этих местах приобретают клиновидную (или подобную усеченной пирамиде) структуру вдоль апикально-базальной оси таким образом, что на ба-

зальном конце становятся шире, чем на апикальном (Schoenwolf and Franks, 1984; Schoenwolf and Smith, 1990). Подобно процессу, протекающему в бутылковидных клетках, инициирующему инвагинацию в ходе гаструляции (см. рис. 11.4), местное сокращение актин-миозиновых комплексов под апикальной поверхностью уменьшает размер апикальной половины клетки по отношению к базальному компартменту; этот процесс известен как **апикальное сокращение**. Апикальное сокращение вместе с базальным положением ядер дает клиновидные клетки шарнирных точек (см. рис. 13.6В, Г; Smith and Schoenwolf, 1987, 1988). Кроме того, последние работы демонстрируют, что скорость деления клеток в дорсально-латеральных доменах нервной пластинки значительно выше, чем в вентральной области, что увеличивает плотность расположения клеток в нервных валиках и увеличивает силы, которые, как предполагается, способствуют изгибанию в ДЛШТ (McShane et al., 2015). Еще предстоит оценить количественно физические силы, действующие в разных областях нервной пластинки, однако на клеточном уровне шарнирные точки формируются за счет: 1) апикального сокращения; 2) базального утолщения, при котором ядро остается в базальной части клетки; 3) уплотнения расположения клеток в нервных валиках.

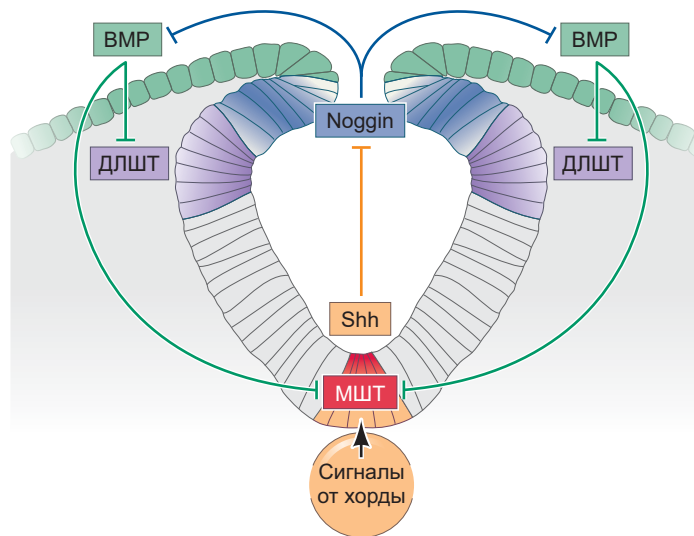
Как происходит регуляция этих изменений клеток в нужных местах нервной пластинки? Есть короткий ответ: формирование шарнирных точек находится под точным контролем сигнального пути BMP. BMP ингибирует формирование МШТ и ДЛШТ, тогда как подавление BMP под воздействием Noggin позволяет сформироваться ДЛШТ; Shh, выделяемый хордой и материалом будущей вентральной части нервной трубки, предотвращает преждевременное и эктопическое формирование шарниров в нервной пластинке (рис. 13.7).



Загадки развития

Что индуцирует формирование МШТ? Существует два свидетельства, что не только точный контроль BMP отвечает за этот процесс: 1) дополнительная хорда может индуцировать формирование эктопической шарнирной точки; 2) Sonic hedgehog подавляет образование ДЛШТ. Может, это ранняя экспрессия Noggin в нотохорде (и продолжающееся подавление им BMP)? Есть еще один факт, который следует иметь в виду: в самом переднем отделе нервной пластинки формируется только МШТ, тогда как в самом заднем образуются только ДЛШТ. Оба типа шарнирных точек представлены только в центральных отделах нервной пластинки. Почему эти шарнирные точки расположены по-разному вдоль передне-задней оси и как регулируются эти различия?

Рис. 13.7 Регуляция формирования шарнирных точек морфогенами. Поверхностная эктодерма (зеленая) экспрессирует BMP, *Noggin* экспрессируется в дорсальной части нервных валиков (синие), а *Shh* экспрессируется вентрально — в хорде и дне нервной трубки (оранжевая). Регуляция работы шарнирных точек сосредоточена вокруг BMP, являющегося антагонистом формирования МШТ и ДЛШТ. *Shh* необходим для детерминации дна нервной трубки, тогда как структура МШТ индуцируется дополнительными сигналами от хорды. *Noggin* напрямую ингибирует лиганды BMP, таким образом снимая их подавление формирования шарнирных точек. Однако ДЛШТ формируется в определенной месте в дорсально-вентральной позиции, что обеспечивает дистанцию источника *Noggin* от ингибиторного градиента *Shh*, секретируемого клетками дна нервной трубки. Поэтому апикальное сокращение происходит только в клетках, находящихся под влиянием достаточно низких концентраций морфогенов BMP (для МШТ и ДЛШТ) и *Shh* (для ДЛШТ)



СОБЫТИЯ СМЫКАНИЯ НЕРВНОЙ ТРУБКИ

Смыкание нервной трубки происходит не одновременно вдоль всей нейральной эктодермы. Этот феномен наиболее представлен у амниот (рептилий, птиц и млекопитающих), у которых ось тела удлиняется до нейруляции. У амниот нейральная индукция происходит в направлении спереди назад. Так, у 24-часового зародыша курицы нейруляция в цефалическом (головном) регионе находится в продвинутом состоянии, а в каудальной (хвостовой) части зародыша все еще происходит гастрულიция (см. рис. 13.5). Два открытых конца нервной трубки называют **передним** и **задним нейропорами** (anterior, posterior).

У курицы смыкание нервной трубки начинается на уровне будущего среднего мозга, и «застегивание» продолжается в обоих направлениях. У млекопитающих, наоборот, закрытие нервной трубки начинается в нескольких местах вдоль передне-задней оси (рис. 13.8). У человека существует, возможно, пять сайтов смыкания нервной трубки (см. рис. 13.5Б; Nakatsu et al., 2000; O'Rahilly and Muller, 2002; Bassuk and Kibar, 2009) и механизмы смыкания могут различаться для каждого из сайтов (Rifat et al., 2010). Ростральный сайт смыкания (место смыкания № 1) находится в месте соединения спинного мозга с задним мозгом и оказывается замкнутым, как в случае нервной трубки у курицы, путем «застегивания» нервных валиков. В сайте смыкания № 2, находящемся на границе переднего и среднего мозга, схожим образом работает направленный механизм типа «застежки-молнии» вместе с динамичным удлинением клеток. В сайте смыкания № 3 (ростральный отдел переднего мозга) за смыкание нервной трубки полностью отвечают ДЛШТ.

Каким образом «застегиваются» края нервных валиков? Существуют ли загадочные силы, последовательно связывающие мембраны клеток по одной за раз вдоль передне-задней оси? Один из способов лучше понять такой сложный процесс, как нейруляция, — просто наблюдать его. Весьма примечательные наблюдения за изображениями живых клеток *in toto* были проведены на культивируемых мышинных зародышах (Pyrgaki et al., 2010; Massarwa and Niswander, 2013). При изгибании нервной пластинки в ДЛШТ клетки, расположенные на смыкающихся вершинах нервных валиков, формируют удлиняющиеся отростки (рис. 13.9). Такое поведение клеток показано для ненейральных клеток поверхностной эктодермы, которые формируют длинные филоподии в направлении примыкающей складки. Эти филоподиальные отростки образуют временные «клеточные мостики», функции которых пока не известны.

СЛИЯНИЕ И РАЗДЕЛЕНИЕ

В итоге нервная трубка образует замкнутый цилиндр, отделенный от поверхностной эктодермы. Оказалось, что это разделение опосредовано экспрессией разных молекул клеточной адгезии. Хотя будущие клетки нервной трубки изначально экспрессируют Е-кадгерин, они прекращают синтезировать этот белок с момента формирования нервной трубки и начинают синтезировать вместо него N-кадгерин (рис. 13.10А). В результате поверхностная эктодерма и нервная трубка утрачивают адгезию друг к другу. Если поверхностную эктодерму в эксперименте заставить экспрессировать N-кадгерин (путем инъекции мРНК N-кадгерина в один из бластомеров двухклеточного зародыша *Xenopus*), отделение нервной

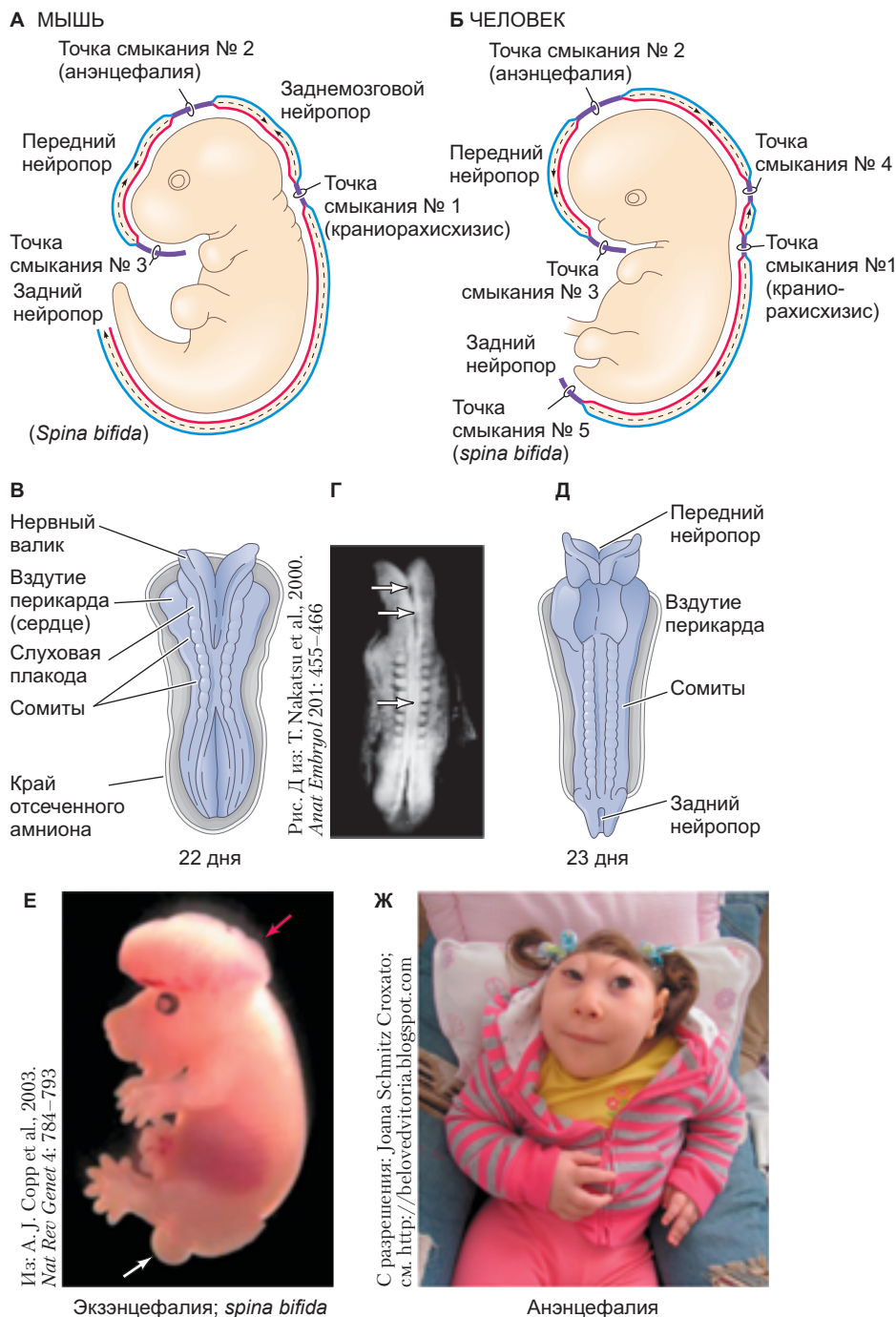
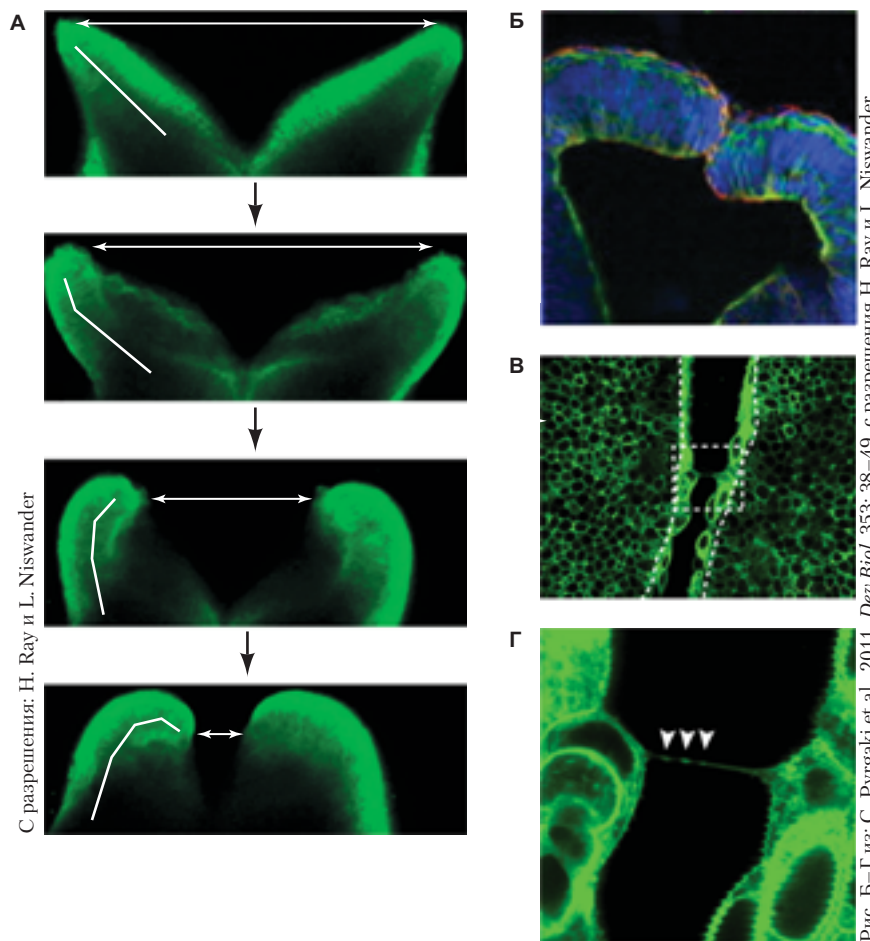


Рис. 13.8 Смыкание нервной трубки у зародышей млекопитающих. **А, Б.** Точки начала смыкания нервной трубки у зародышей мыши (**А**) и человека (**Б**). В дополнение к трем точкам начала смыкания, обнаруженным у мыши, этот процесс у человека начинается также на заднем конце заднего мозга и в поясничном отделе. **В.** Вид с дорсальной стороны на 22-дневный зародыш человека (стадия восьми пар сомитов) во время начала нейруляции. Оба нейропора, задний и передний, открыты в амниотическую жидкость. **Г.** Зародыш человека на стадии 10 пар сомитов, демонстрирующий главные точки начала смыкания нервной трубки (показаны стрелками). **Д.** Вид с дорсальной стороны на 23-дневный зародыш человека, когда с ходом нейруляции открытыми остаются только нейропоры. **Е.** Экэнцефалия среднего мозга и открытая *spina bifida*, наблюдаемая у мышей с мутацией *curly tail*, гипоморфной мутацией в гене *grainyhead-like3*. **Ж.** Vitoria de Crist, прожившая с анэнцефалией 2,5 года. Анэнцефалия развивается в случае неполного смыкания нервной трубки в точках 2 и 3, в результате чего передний мозг остается в контакте с амниотической жидкостью и в дальнейшем дегенерирует. (Рис. А, Б по данным: A. G. Bassuk and Z. Kibar, 2009. *Semin Pediatr Neurol* 16: 101–110.)

Рис. 13.9. Смыкание нервной трубки в точке смыкания № 2 (область среднего мозга; см. рис. 13.8А).

А. Прижизненная съемка зародыша трансгенной мыши CAG: Venus^{мут}, позволяющая наблюдать мембраны клеток, на стадии 15 пар сомитов. Оптические поперечные срезы (сделаны в дорсально-вентральной плоскости); ряд фото от верхнего к нижнему показывает формирование ДЛШТ. Место формирования ДЛШТ отмечено изгибом белой линии на левой складке к месту смыкания, обозначенному двусторонними стрелками уменьшающейся длины. **Б.** Оптический срез через зародыш мыши в момент, когда нервные валики соприкасаются, но еще не сомкнулись. Однослойная ненейральная покровная эктодерма (крупные уплощенные клетки; окрашены в *зеленый*) заворачивается вокруг нейральной эктодермы (окрашена в *синий*) по краю замыкающихся нервных валиков. **В.** Пунктир показывает границу между нейральной и ненейральной эктодермой. Клеточные мостики между клетками ненейральной эктодермы соединяют два нервных валика, расположенные напротив друг друга. **Г.** Увеличенное изображение одного из таких мостиков (область из рамки на рис. В), указанного наконечниками стрелок



С разрешения: Н. Ray и L. Niswander

Рис. Б–Г из: С. Pyrgaki et al., 2011. *Dev Biol* 353: 38–49, с разрешения Н. Ray и L. Niswander

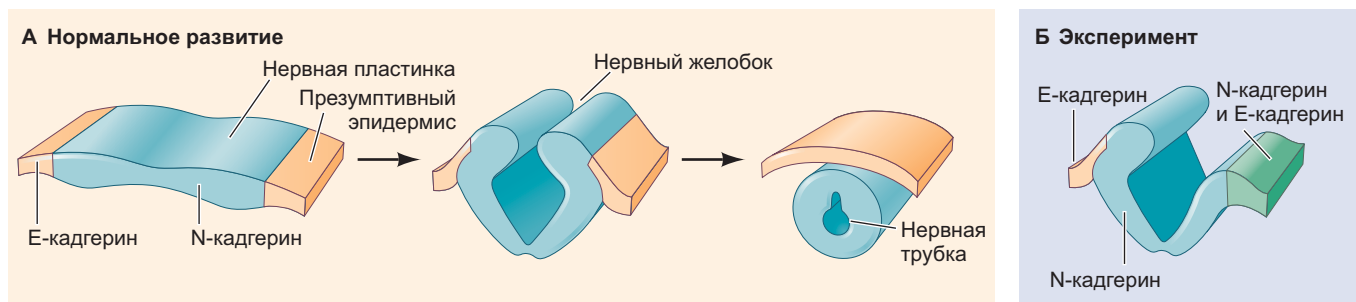


Рис. 13.10. Экспрессия белков адгезии, N- и E-кадгеринов, в ходе нейруляции у *Xenopus*. **А.** Нормальное развитие. На стадии нервной пластинки N-кадгерин можно наблюдать в нервной пластинке, тогда как E-кадгерин обнаруживается только в презумптивном эпидермисе. В конечном счете нейральные клетки, экспрессирующие N-кадгерин, отделяются от E-кадгерин-положительных эпидермальных клеток. (Клетки нервного гребня не экспрессируют ни N-, ни E-кадгерины, и они рассеяны.) **Б.** Отделение нервной трубки не происходит, когда в одну половину зародыша инъецирована мРНК N-кадгерина, т. е. он экспрессирован в эпидермальных клетках, а также в презумптивной нервной трубке

трубки от презумптивного эпидермиса будет сильно затруднено (рис. 13.10Б; Detrick et al., 1990; Fujimori et al., 1990). Утрата функции гена N-кадгерина у *Danio rerio* выражается в невозможности формирования нервной трубки (Lele et al., 2002). Особенно в этом процессе важен транскрипционный фактор Grainyhead (Rifat et al., 2010; Werth et al., 2010; Pyrgaki et al., 2011). Например, белок Grainyhead-like2 контролирует целый дивизион молекул клеточной адгезии и подавляет синтез E-кадгерина в нервных валиках. Мыши с мутациями по генам *Grainyhead-like2* или *Grainyhead-like3* имеют серьезные дефекты нервной трубки (см. рис. 13.8Е; Pyrgaki et al., 2011).

ДЕФЕКТЫ СМЫКАНИЯ НЕРВНОЙ ТРУБКИ

У людей дефекты смыкания нервной трубки наблюдаются с частотой около 1 случая на 1000 живорожденных. Неудачное закрытие заднего нейропора (точка смыкания № 5; см. рис. 13.8Б) на 27-й день развития приводит к состоянию под названием *spina bifida*, тяжесть которого зависит от того, насколько большая часть спинного мозга осталась открытой. Из-за невозможности смыкания в точках № 2 или № 3 роstralной части нервной трубки сохраняется открытым передний нейропор, что ведет обычно к летальному состоянию, называемому **анеэнцефалия**, при котором передний мозг остается в контакте с амниотической жидкостью и впоследствии дегенерирует. Передний мозг зародыша перестает развиваться, и свод черепа не может сформироваться (см. рис. 13.8Ж). Неспособность нервной трубки к смыканию вдоль всей оси тела называют **краниорахисшизисом**.



Загадки развития

Что задает направление смыкания нервной трубки? «Застегивание» происходит в направлении от заднего конца к переднему у оболочника *Ciona*, а также в некоторых точках смыкания у млекопитающих, а еще в противоположных направлениях — при смыкании других отделов мозга у млекопитающих. Более того, консервативны ли среди позвоночных клеточные силы, обеспечивающие смыкание нервной трубки у примитивного хордового *Ciona*?

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЧИНЫ ДЕФЕКТОВ ФОРМИРОВАНИЯ НЕРВНОЙ ТРУБКИ

Причины нарушений в смыкании нервной трубки могут быть как генетического, так и экологического характера (Fournier-Thibault et al., 2009; Harris and Juriloff, 2010; Wilde et al., 2014). Мутации в таких генах как *Pax3*, *Sonic hedgehog*, *Grainyhead*,

Tfap2 и *Open-brain*, впервые описанные у мышей, показали, что экспрессия этих генов необходима для формирования нервной трубки у млекопитающих; на самом деле в этот процесс оказались вовлеченными более 300 генов. Факторы окружающей среды, включая лекарства, особенности диеты матери (например, недостаток холестерина, цинка и фолата, также известного как фолиевая кислота или витамин B₉), диабет, ожирение и токсичные вещества могут оказывать влияние на процесс смыкания нервной трубки у человека. Как эти факторы приводят к ее дефектам — по большей части неизвестно. Например, показано, что дефицит цинка нарушает смыкание нервной трубки путем стабилизации p53 и последующего увеличения активности апоптоза (рис. 13.11А; Li et al., 2018). Однако одна из основных причин появления дефектов нервной трубки — недостаток фолиевой кислоты. Существует точка зрения, согласно которой основным следствием изменений внешней среды является модификация эпигенома зародыша, приводящая к изменению транскрипции и последующим дефектам нервной трубки (рис. 13.11В; Feil et al., 2012; Shyamasundar et al., 2013; Wilde et al., 2014). В основном это нарушение может быть связано с последствиями метаболизма фолиевой кислоты.

Хотя точная роль фолата остается неизвестной, ранний прием женщинами при беременности лекарств — антагонистов фолиевой кислоты приводил к развитию плода с дефектами нервной трубки. Было проведено множество широко-масштабных исследований на людях, демонстрирующих четкую корреляцию между дефектами развития нервной трубки и дефицитом фолиевой кислоты; именно поэтому фолиевая кислота в виде пищевой добавки рекомендована не только беременным женщинам; ею систематически обогащают продукты питания (Wilde et al., 2014). Каким образом дефицит фолиевой кислоты приводит к дефектам нервной трубки? Этот вопрос сейчас активно изучают. Фолиевая кислота представляет собой важный питательный элемент, используемый для регуляции синтеза ДНК в ходе деления клеток в мозге (Anderson et al., 2012), и ответственный за регуляцию метилирования ДНК (рис. 13.11В). Дополнительным доказательством важности эпигенетических механизмов для правильного развития нервной трубки послужили наблюдения того, что функциональные манипуляции с гистон-модифицирующими ферментами (ацетилтрансферазами, деацетилазами, деметилазами) приводят к дефектам нервной трубки (Artama et al., 2005; Bu et al., 2007; Shpargel et al., 2012; Welstead et al., 2012; Murko et al., 2013). Вне зависимости от механизма было подсчитано, что 25–30% врожденных дефектов нервной трубки у человека могут быть

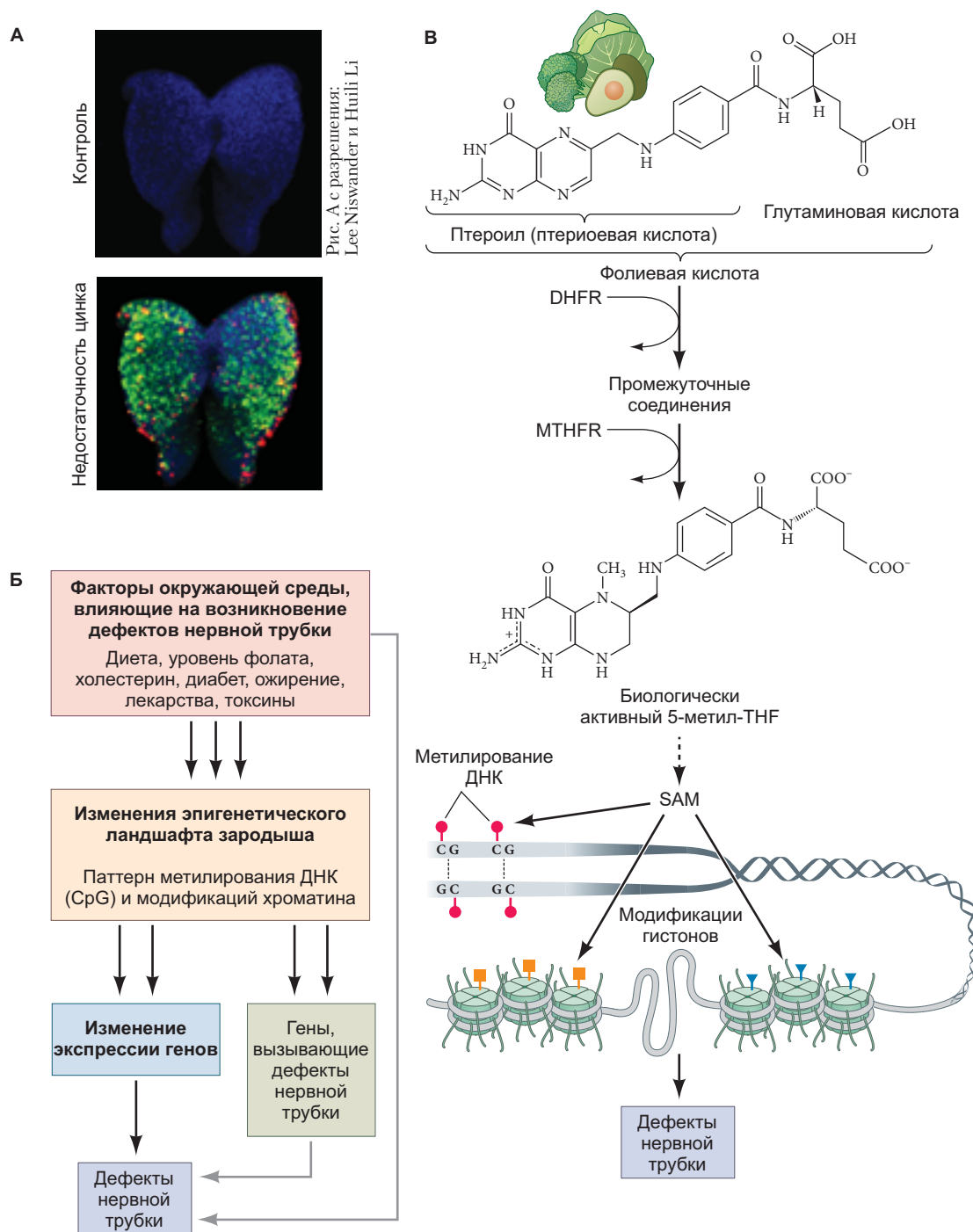


Рис. 13.11. Влияние окружающей среды на дефекты нервной трубки и роль фолиевой кислоты. **А.** Вид с дорсальной стороны на передний конец нервной трубки (развивающийся мозг) контрольного зародыша мыши и зародыша, обработанного цинксвязывающим хелатором TPEN. Недостаток цинка приводит к существенному увеличению частоты апоптоза, что демонстрирует фрагментация ДНК (метод TUNEL, *зеленый*) и расщепление каспазой-3 (*красный*). Нуклеиновые кислоты окрашены красителем Hoechst (*синий*). **Б.** Обзор связей факторов окружающей среды с дефектами нервной трубки. *Черные стрелки* показывают основные предположения — как факторы окружающей среды могут вызывать дефекты формирования нервной трубки. *Серыми стрелками* отмечены иные возможные пути, приводящие к ДНТ. **В.** Упрощенный биохимический путь метаболизма фолиевой кислоты, ведущий к эпигенетической регуляции через метилирование ДНК или модификацию гистонов. DHFR — дигидрофолатредуктаза; MTNFR — метилтетрагидрофолатредуктаза; 5-метил-THF — 5-метилтетрагидрофолат; SAM — S-аденозилметионин

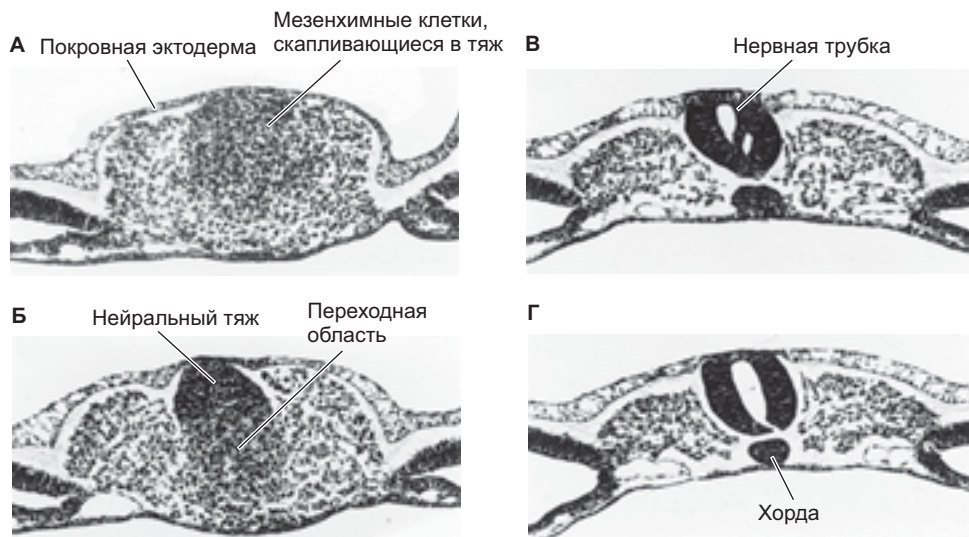
предупреждены, если беременная женщина дополнительно принимает фолат. Поэтому в США женщинам детородного возраста рекомендован ежедневный прием 0,4 мг фолата (Milunsky et al., 1989; Centers for Disease Control, 1992; Czeizel and Dudás, 1992).

Вторичная нейруляция

Вторичная нейруляция, имеющая место в наиболее заднем отделе зародыша в ходе удлинения хвостовой почки, приводит к формированию нервной трубки совершенно иным путем, нежели первичная (см. рис. 13.4). Процесс вторичной нейруляции включает выделение мезенхимных клеток из проспективной эктодермы и мезодермы с последующим уплотнением этих клеток в медулярный тяж под поверхностной эктодермой (**рис. 13.12А, Б**). После такого мезенхимо-эпителиального перехода центральная часть подвергается кавитации с образованием нескольких полостей, или просветов (lumens) (рис. 13.12В); просветы затем сливаются в единую центральную полость (рис. 13.12Г; Schoenwolf and Delongo, 1980).

Мы видели, что после миграции Гензеновского узелка на задний конец зародыша каудальная область эпибласта зародыша содержит популяции клеток-предшественников, дающих начало нейральной эктодерме и параксиальной мезодерме (мезодерме сомитов) в ходе удлинения туловища зародыша (Tzouanas et al., 2009). Эктодермаль-

ные клетки, формирующие задний отдел нервной трубки путем вторичной нейруляции, экспрессируют ген *Sox2*, тогда как ингрессирующие мезодермальные клетки (которые более не подвержены влиянию высокого уровня BMP, так как мигрируют под эпибласт) не экспрессируют его. Ингрессирующие мезодермальные клетки экспрессируют *Tbx6* и формируют сомиты (см. гл. 17; Simokita et al., 2010; Takemoto et al., 2011). Способность транскрипционного фактора *Tbx6* подавлять экспрессию *Sox2*, индуцирующего нейральное развитие клеток, объясняет причудливый фенотип мышей — гомозиготных мутантов по *Tbx6*, имеющих в заднем отделе тела три нервных трубки (см. рис. 17.4; Chapman and Papaioannou, 1998; Takemoto et al., 2011). У этих мышей два тяжа параксиальной мезодермы становятся нервными трубками, в которых должным образом экспрессируются регионспецифичные гены (например, *Pax6*). Таким образом, эпибласт, окружающий ростральную первичную полосу (каудальный латеральный эпибласт; см. гл. 12), содержит пул общих предшественников параксиальной мезодермы и нервной пластинки, формирующей спинной мозг (Cambray and Wilson, 2007; Wilson et al., 2009). Это отличие подчеркивает другую фундаментальную разницу между первичной и вторичной нейруляцией. В ходе первичной нейруляции поверхностная эктодерма и нейральная эктодерма тесно связаны в течение процесса смыкания нервной трубки, тогда как в ходе вторичной нейруляции эти две ткани не связаны и развиваются независимо друг от друга.



Из: M. Catala et al., 1995. *Mech Dev* 51: 51–65, с разрешения N. M. Le Douarin

Рис. 13.12. Вторичная нейруляция в каудальном отделе куриного зародыша. Зародыш на стадии 25 пар сомитов. **А.** Мезенхимные клетки скапливаются и уплотняются с образованием медулярного тяжа на заднем конце хвостовой почки куриного зародыша. **Б.** Медулярный тяж чуть кпереди в хвостовой почке. **В.** Нервная трубка, образуемая путем кавитации, и хорда; обратите внимание на наличие нескольких отдельных просветов в нервной трубке. **Г.** Слияние полостей с образованием центрального канала нервной трубки

Разметка центральной нервной системы

Раннее развитие мозга протекает у большинства позвоночных схожим образом (**рис. 13.13А–Г**). Поскольку мозг человека, возможно, наиболее организованный образец материи в солнечной системе и определенно самый интересный орган во всем животном царстве, мы сфокусируемся на развитии того, что предположительно делает *Ното* разумным.

Передне-задняя ось

У раннего зародыша млекопитающих нервная трубка представляет собой прямую структуру, но даже до формирования задней части трубки наиболее передний ее отдел подвергается серьезным изменениям. Передний отдел нервной трубки раздувается в три первичных мозговых пузыря: **передний мозг** (*prosencephalon*) формирует полушария головного мозга; нейроны **среднего мозга** (*mesencephalon*) вовлечены в возбуждение, движение и торможение (Niwa et al., 2013; Tye et al., 2013); **задний мозг** (*rhombencephalon*) дает мозжечок, мост и *medulla oblongata* (наиболее древнюю область мозга и центр произвольных движений, таких как дыхание; **рис. 13.13Д**). К моменту смыкания переднего конца нервной трубки формируются вторичные пузыри. Передний мозг превращается в *telencephalon* (формирует полушария головного мозга) и *diencephalon* (образует глазные пузыри, инициирующие развитие глаз).

Задний мозг (*rhombencephalon*) приобретает сегментированный паттерн, определяющий места отхождения определенных нервов. Периодически расположенные вздутия, называемые **ромбомерами**, подразделяют задний мозг на более мелкие отделы. Ромбомеры представляют собой отдельные «территории»; клетки свободно перемешиваются в пределах каждого ромбомера, но никогда не смешиваются с клетками соседнего (Guthrie and Lumsden, 1991; Lumsden, 2004). В каждом из ромбомеров экспрессируется уникальная комбинация транскрипционных факторов, таким образом генерируя ромбомерспецифичный паттерн нейронной дифференцировки. Вследствие этого каждый из ромбомеров дает нейроны с разным статусом. Как мы увидим в гл. 15, клетки нейрального гребня, берущие начало из ромбомеров, будут формировать **ганглии** — кластеры тел нейронов, аксоны которых составляют нерв. Ганглий каждого ромбомера образует нерв отдельного типа. Формирование черепных нервов из ромбомеров наиболее тщательно было изучено у курицы, у которой первые нейроны появляются в четных ромбомерах r2, r4 и r6 (**рис. 13.14**; Lumsden and Keynes, 1989). Нейроны, происходящие из ганглия r2, образуют V (тройничный) черепной нерв, из ганглия r4 дают VII

(лицевой) и VIII (вестибулярно-слуховой) черепные нервы, из ромбомера r6 — IX (языкоглоточный) черепной нерв.

Паттернирование заднего и спинного мозга в передне-заднем направлении контролирует группа генов, включающая комплексы *Нох-генов*.

Дорсально-вентральная ось

Нервная трубка поляризована вдоль дорсально-вентральной оси. В спинном мозге, например, дорсальной стороной является место, где спинномозговые нейроны получают входящий сигнал от сенсорных нейронов, а вентральной стороной — место нахождения моторных нейронов. В середине находится множество интернейронов (вставочных нейронов), передающих информацию между сенсорными и моторными нейронами (**рис. 13.15**). Эти дифференцированные клеточные типы, выстроенные вдоль дорсально-вентральной оси, происходят из популяций прогениторных клеток, примыкающих к полостям (желудочкам) головного и спинного мозга, идущим вдоль передне-задней оси (т. е. в вентрикулярной зоне). Каждый прогениторный домен можно распознать по экспрессии специфичных транскрипционных факторов (таких как белковые продукты гомеобоксных генов вроде *Pax7*), которые направляют прогениторы к дифференцировке в специфичные классы нейронов и глиальных клеток, формирующих ЦНС (Catela et al., 2015). Отсюда следует логичный вопрос: как клетка чувствует свое положение внутри нервной трубки, чтобы развиваться в популяцию прогениторных клеток, генерирующую нейроны и глию определенного типа и в правильном месте? Другими словами, как создается паттерн в нервной трубке?

Противостоящие морфогены

Дорсально-вентральную полярность нервной трубки определяют морфогенетические сигналы, поступающие из ее непосредственного окружения. В спинной области вентральный паттерн диктуется хордой, тогда как дорсальную сторону индуцирует лежащий сверху эпидермис (**рис. 13.16А–Г**). Спецификацию оси инициируют два основных паракринных фактора: белок *Sonic hedgehog* (*Shh*), выделяющийся из хорды, и белки *TGFβ*, выделяющейся из дорсальной эктодермы (**рис. 13.16Д**). В обоих случаях эти факторы индуцируют появление вторичного сигнального центра в самой нервной трубке.

Белок *Shh*, секретируемый хордой, индуцирует клетки медиального шарнира становиться клетками пластинки **дна** нервной трубки. Клетки пластинки дна нервной трубки тоже секретируют *Shh*, который образует градиент с наибольшей концентрацией на вентральной стороне нервной трубки

(рис. 13.16Б, В, Д). Клетки, подвергающиеся воздействию наиболее высоких концентраций Shh, развиваются в прогениторные клетки моторных и вставочных нейронов класса V3, тогда как сред-

ние и низкие концентрации Shh индуцируют все более и более дорсальные популяции прогениторных клеток (рис. 13.16Г и рис. 13.16Е, Ж; Roelink et al., 1995; Briscoe et al., 1999).

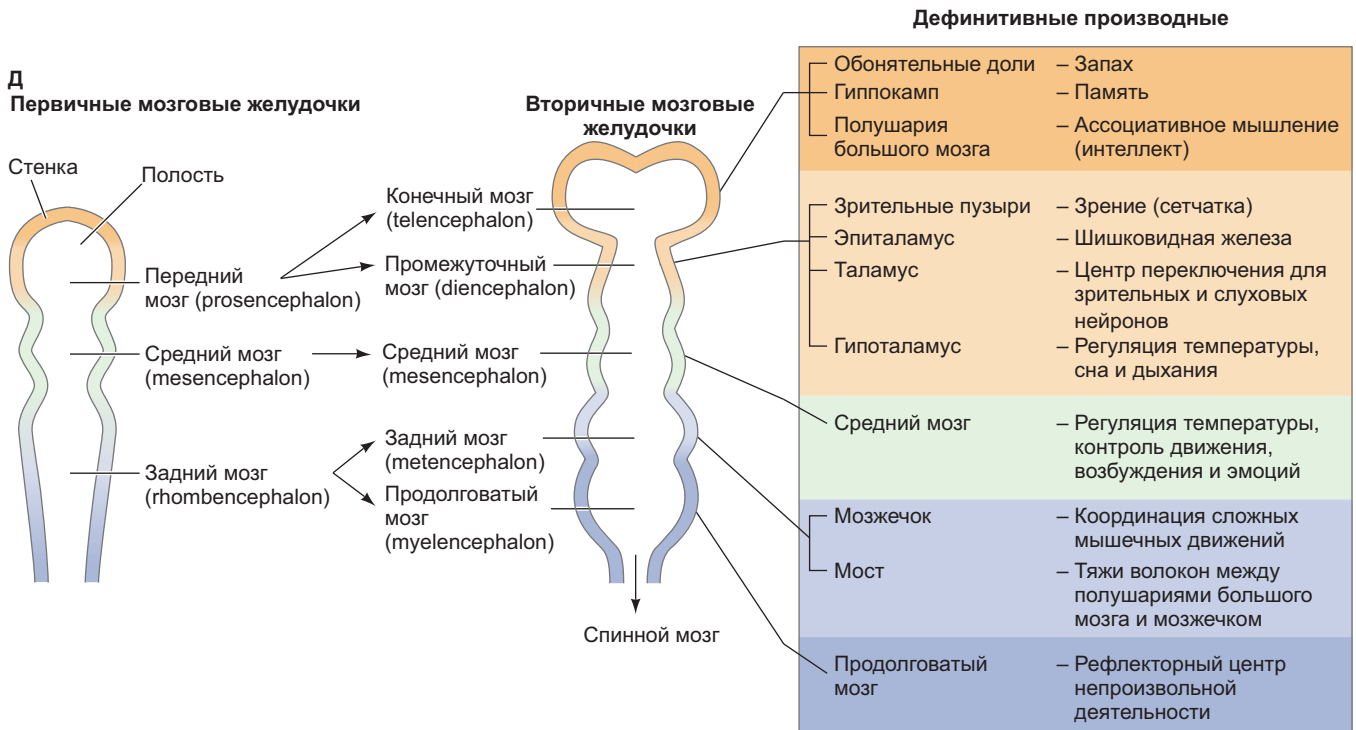
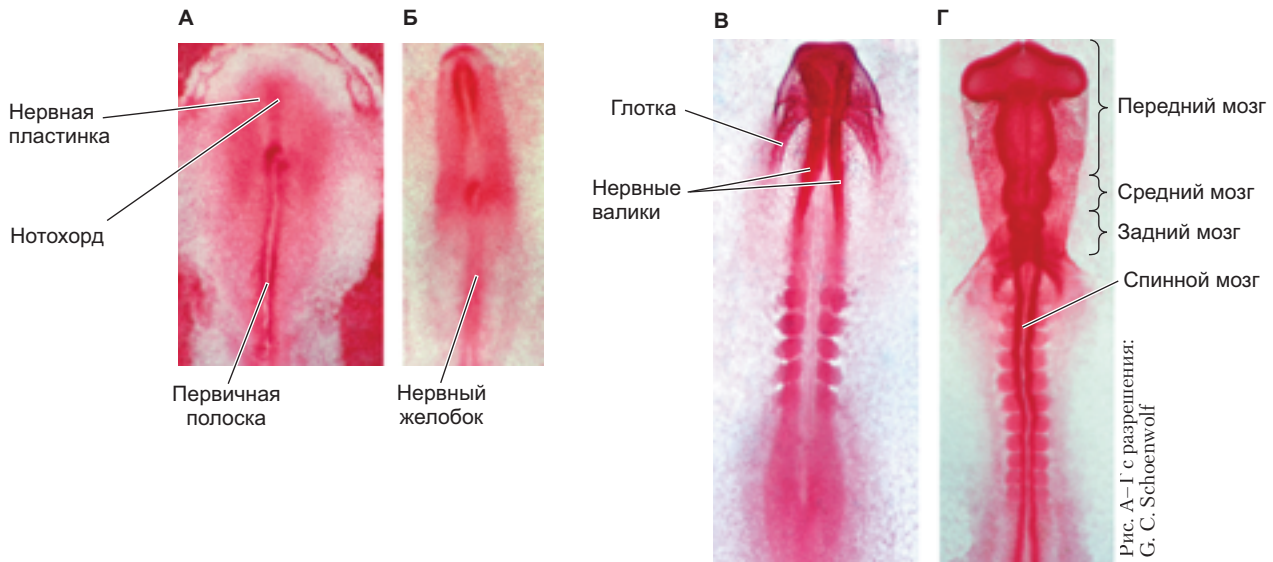
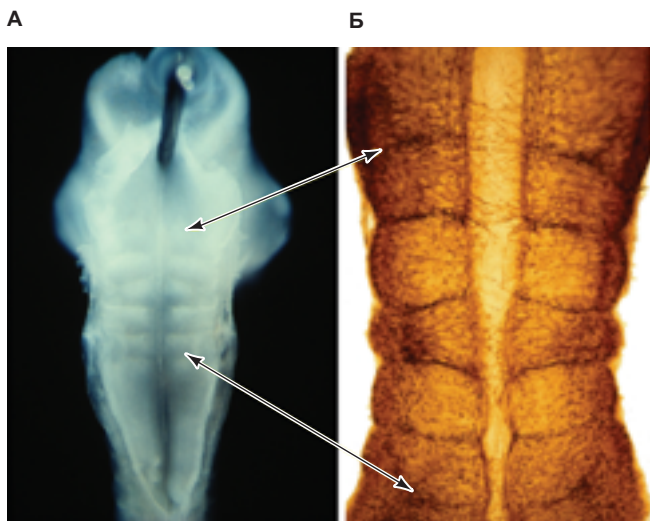


Рис. 13.13 Раннее развитие головного мозга и формирование первых камер мозга. Развитие головного мозга курицы. **А.** Плоская нервная пластинка с подлежащей хордой (головной отросток). **Б.** Нервный желобок. **В.** Нервные валики начинают смыкаться в наиболее дорсальной области с образованием зарождающейся нервной трубки. **Г.** Нервная трубка, демонстрирующая три отдела головного мозга и спинной мозг. Она остается открытой на переднем конце, зрительные пузыри (становящиеся впоследствии сетчаткой) расширились к латеральным краям головы. **Д.** Как у человека, три первичных мозговых пузыря подразделяются далее в ходе развития. Справа приведен список дефинитивных производных стенок и полостей головного мозга вместе с некоторыми их функциями. (Рис. Д по данным: K. L. Moore and T. V. M. Persaud, 1977. *The Developing Human: Clinical Oriented Embryology* 2e, p. 337. W. B. Saunders: Philadelphia.)

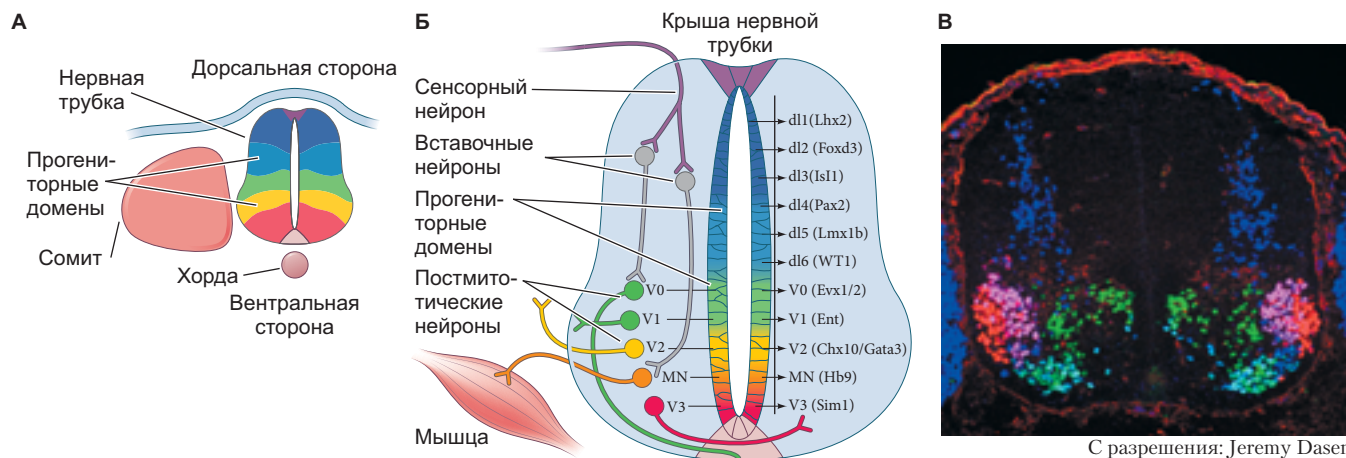


Из: A. Lumsden. 2004. *Mech Dev* 121: 1081–1088, с разрешения A. Lumsden

Рис. 13.14. Ромбомеры заднего мозга куриного зародыша. **А.** Задний мозг трехдневного зародыша курицы. Крыша нервной трубки удалена, что позволяет видеть сегментированную структуру нейрального эпителия. Граница r1/r2 отмечена *верхней стрелкой*, граница r6/r7 — *нижней*. **Б.** Задний мозг куриного зародыша на похожей стадии, окрашенный антителами к нейрофиламентам. Границы ромбомеров выделяются на общем фоне, так как они работают в качестве каналов для нейронов, идущих с одной стороны мозга на другую

Дорсальное развитие нервной трубки обусловлено белками суперсемейства TGF β , в основном BMP4, BMP7, дорсалином и активином (Liem et al., 1995, 1997, 2000). Изначально BMP4 и BMP7 были обнаружены в эпидермисе. Сразу после формирования вторичного сигнального центра — дна нервной трубки — на вентральной ее стороне эпидер-

мис создает вторичный сигнальный центр за счет индукции экспрессии BMP4 в клетках пластинки **крыши** нервной трубки. Белок BMP4 из пластинки крыши нервной трубки запускает каскад TGF β в близлежащих клетках (рис. 13.16). Дорсальная часть клеток становится, таким образом, экспонирована к TGF β в большей концентрации и раньше,



С разрешения: Jeremy Dasen

Рис. 13.15. Дифференциальная экспрессия транскрипционных факторов определяет прогени-торные домены и производные клеточные типы вдоль дорсально-вентральной оси. **А.** Ранняя нервная трубка состоит из прогениторных нейроэпителиальных клеток, которые можно сгруп-пировать в дискретные домены на основании уникального репертуара экспрессируемых транс-крипционных факторов. Pax3 и Pax7 определяют дорсальный домен (*темно-синий*), Nkx6–1 экс-прессируется вентрально (*красный*), а Pax6 локализован в центральной области нервной трубки (*зеленый*). Перекрывания в экспрессии этих транскрипционных факторов создают субдомены (*желтый* и *голубой*). **Б.** Прогениторные зоны расширяются по мере развития нервной труб-ки и продолжают приобретать различия в связи с созреванием их генных регуляторных сетей, до тех пор пока не будет сформирована полная программа дифференцировки и не появятся про-изводные типы клеток (такие, как показанные различные типы нейронных клеток). **В.** Иммуно-мечение на некоторые из транскрипционных факторов, экспрессирующихся в разных областях, показанных на рис. Б: транскрипционные факторы Isl1 (*синий*), Foxp1 (*красный*) и Lhx3 (*зеле-ный*) в спинном мозге мышиноного эмбриона (в возрасте 12,5 дня) на шейном уровне. (Рис. А, Б по данным: C. Catela et al., 2015. *Annu Rev Cell Dev Biol* 31: 669–698.)

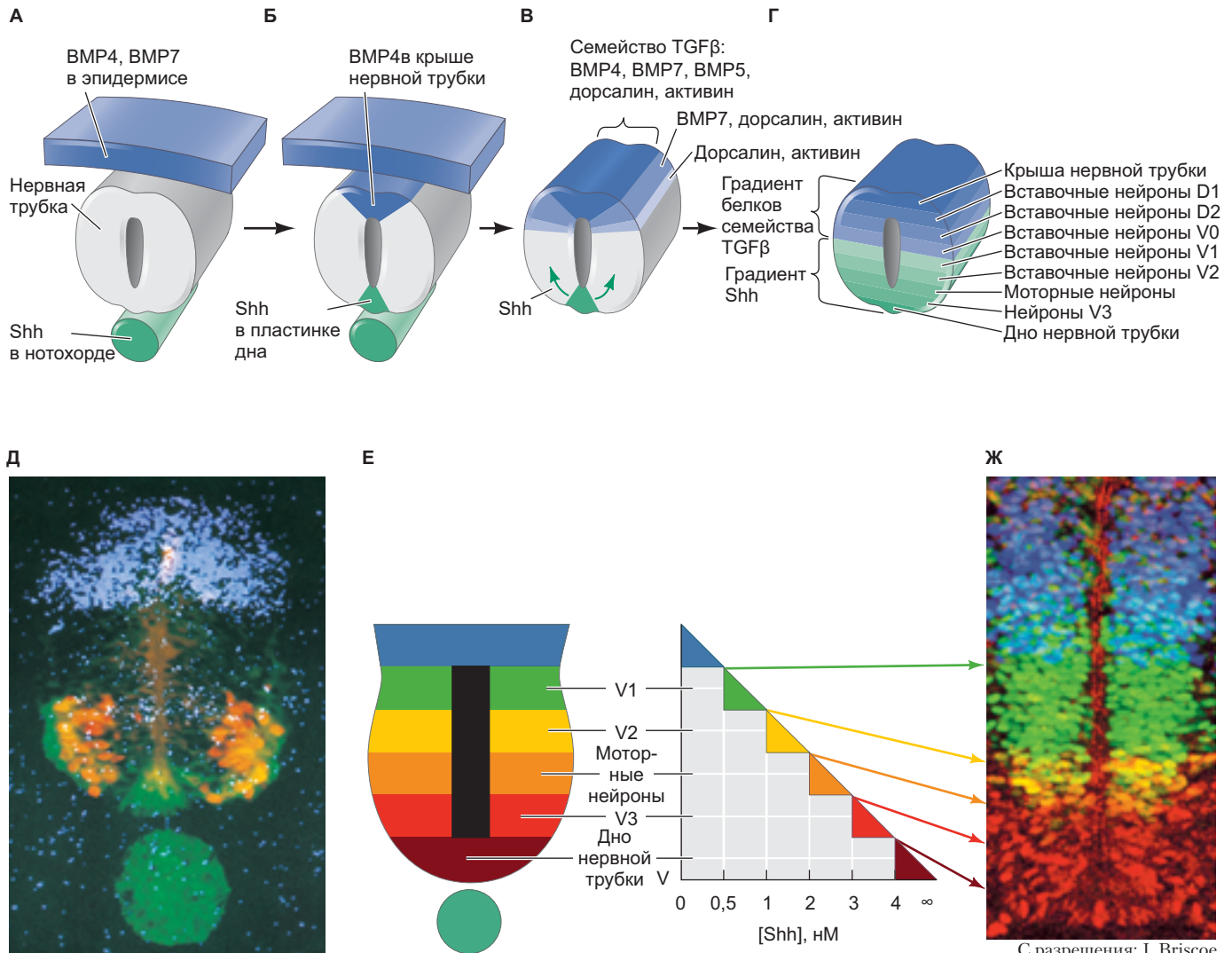


Рис. 13.16. Дорсально-вентральная спецификация нервной трубки. **А.** Вновь сформированная нервная трубка находится под влиянием двух сигнальных центров. Крыша нервной трубки находится под влиянием BMP4 и BMP7, экспрессируемым эпидермисом, дно экспонировано к выделяемому хордой Sonic hedgehog (Shh). **Б.** Вторичные сигнальные центры устанавливаются в нервной трубке. BMP4 экспрессируют и секретируют клетки крыши нервной трубки, Shh — клетки дна нервной трубки. **В.** Белок BMP4 запускает каскад факторов TGFβ, распространяющийся вентрально по нервной трубке от ее крыши. Shh диффундирует в дорсальном направлении из клеток дна нервной трубки. **Г.** Нейроны спинного мозга приобретают индивидуальность под воздействием градиентов этих двух паракринных факторов. Количество и тип паракринных факторов, зависящие от положения клетки в нервной трубке, определяют, какие транскрипционные факторы будут активированы в ядре данной клетки. **Д.** Нервная трубка куриного зародыша демонстрирует область Shh (зеленый) и домен экспрессии белка дорсалин (синий; дорсалин является членом суперсемейства TGFβ). Дифференцировку двигательных нейронов индуцирует конкретная концентрация Shh, показанная оранжевым/желтым. **Е.** Взаимосвязь между концентрациями Shh, дифференцировкой отдельных нейронных типов *in vitro* и дистанций от нотохорда. Клетки, ближайшие к хорде, становятся клетками дна нервной трубки; двигательные нейроны и вставочные нейроны класса V3 появляются на вентролатеральных сторонах. **Ж.** Гибридизация *in situ* с зондами к трем транскрипционным факторам: Pax7 (синий; характерен для дорсальных клеток нервной трубки), Pax6 (зеленый) и Nkx6-1 (красный). В месте перекрывания Nkx6-1 и Pax6 (желтый) будут специфицироваться двигательные нейроны. (Рис. Е по данным: J. Briscoe et al., 1999. *Nature* 398; 622–627.)

чем соседние нейральные клетки. Важность факторов суперсемейства TGF β в разметке дорсальной части нервной трубки была продемонстрирована фенотипами мутантов у *Danio rerio*. Эти мутанты, дефицитные по отдельным белкам BMP, были лишены дорсальных и вставочных типов нейронов (Nguyen et al., 2000).

Все оси сходятся

Модель дорсально-вентральной разметки под влиянием морфогенов TGF β и Shh справедлива для определения судеб клеток во всей ЦНС вдоль ростокаудальной оси. Не забывайте, однако, что существуют различия между механизмами формирования нервной трубки в переднем и заднем отделах

тела — различия эти определены первичной и вторичной нейруляцией. Путь развития прогениторных клеток в *передних* областях нервной трубки (которые станут головным и большей частью спинного мозга) предопределена непосредственно в эпибласте (Harland, 2000; Stern, 2005). Клетки задних областей зарождаются как бипотенциальные **нейромезодермальные предшественники** (НМП), подвергающиеся превращению в клетки нейрального типа или клетки сомитов, причем нейральные клетки формируют каудальный конец нервной трубки (**рис. 13.17**). НМП зарождаются в каудальном латеральном эпибласте в ходе удлинения хвостовой почки; их поддерживают сигналы Fgf8 и Wnt (см. гл. 17 о подробностях удлинения аксона). В противовес каудальным сигналам Fgf/Wnt мезодерма сомитов выделяет ретиноевую кислоту, ингибирующую сигналы Fgf8. Таким образом вдоль ростокаудальной оси складываются

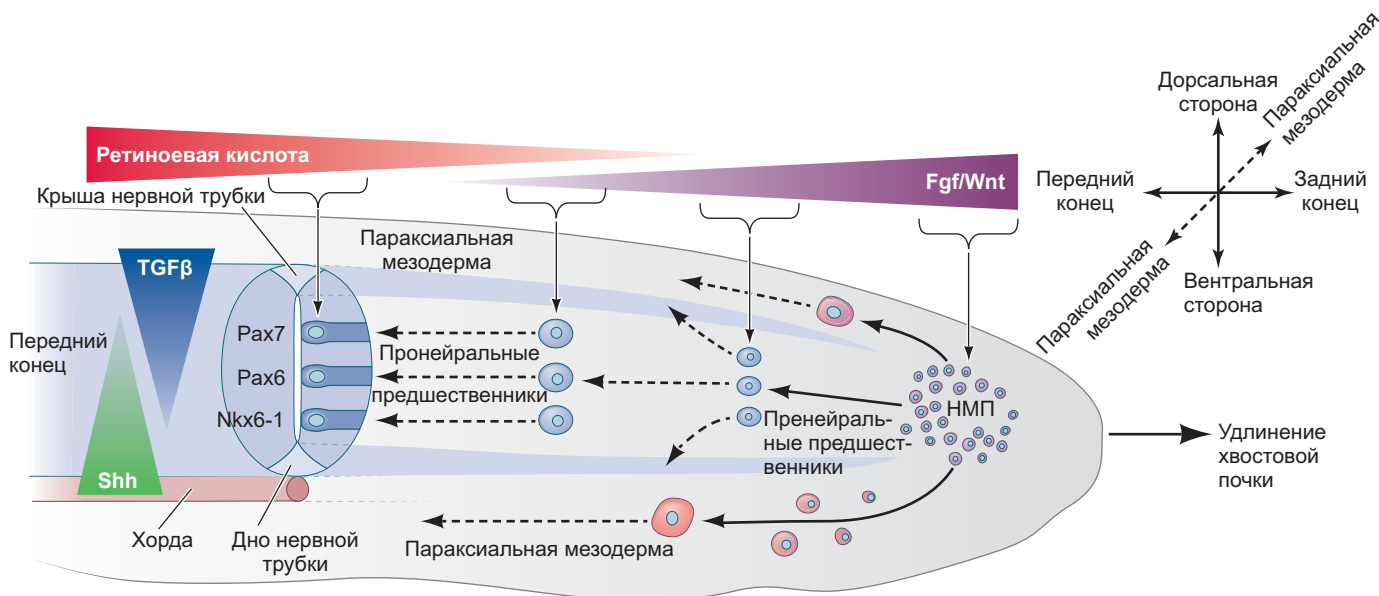


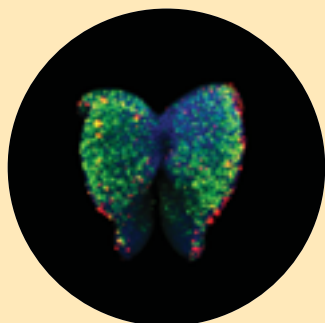
Рис. 13.17. Модель конвергенции сигналов при созревании и спецификации нейральных предшественников в развитии каудального отдела спинного мозга. В ходе развития спинного мозга хвост удлиняется при участии латерального каудального эпибласта, который содержит пролиферативные и способные к миграции нейромезодермальные прогениторы (НМП). В ходе процесса НМП покидают хвостовую почку и развиваются в нейральную мезенхиму/нервную пластинку или мезенхиму параксиальной мезодермы, где они сформируют нервную трубку или сомиты соответственно. (Пунктирными стрелками показано, что эти клетки вносят вклад в указанные регионы нервной трубки, но активная миграция клеток в эти регионы не происходит.) Противостоящие друг другу антагонистические морфогены, ретиноевая кислота (ПК) и Fgf/Wnt, формируют инвертированный градиент вдоль ростокаудальной оси, создавая градуированную шкалу позиционной информации вдоль оси. Высокий уровень Fgf/Wnt поддерживает пул НМП. Средний уровень Fgf/Wnt и низкая концентрация ПК делает ранних пренеуральных предшественников компетентными к ответу на TGF β и Shh, дорсально-вентральные сигналы и к развитию в крышу или дно нервной трубки соответственно. По мере удлинения хвостовой почки пренеуральные предшественники будут находиться под воздействием все меньших концентраций Fgf/Wnt и все больших ПК, что расширит их компетенции до запуска генных регуляторных программ, специфичных для популяций пронеуральных предшественников. Таким образом, морфогены определяют путь развития клеток вдоль всех осей в нервной трубке

антагонистичные градиенты ретиноевой кислоты и Fgf/Wnt, определяющие путь созревания НМП. Клетки, входящие в нейральную мезенхиму, становятся пронеиральными прогениторными клетками и изначально компетентны по отношению к сигналам Shh и BMP путем дифференцировки в дно или крышу нервной трубки соответственно. С удлинением хвостовой почки пронеиральные НМП оказываются дальше от источника Fgf/Wnt и ближе к источнику ретиноевой кислоты. Такая передислокация запускает переключение их компетентности к ответу на сигналы Shh/TGF β , что позволяет паттернировать пронеиральные предшественники вдоль дорсально-вентральной оси созревающей нервной трубки (Sasai et al., 2014; Gouti et al., 2015; Henrique et al., 2015; Stevenon and Martinez Arias, 2017).



Загадки развития

Мы описали сложную морфогенетическую систему, которая передает позиционную информацию для развития у клеток индивидуальности. Но что если компетентная клетка не статична, а движется? Как это изменит динамику интерпретации градиента? В лаборатории Мегасона было показано, что специфицированные прогениторные клетки в нервной трубке у *Danio rerio* фактически движутся по эпителию и самостоятельно сортируются в дискретные домены (Xiong et al., 2013). Таким образом, в модели формирования паттерна нервной трубки необходимо учитывать новую динамику движения клеток в среде морфогенетических сигналов.



С разрешения: Lee Niswander и Huili Li

О фотографии в начале главы

Вы выделили этот превосходный флуоресцентный снимок из лаборатории Нисвандера в самом начале главы (см. рис. 13.11). Он демонстрирует, что дефицит цинка в диете матери может послужить причиной дефектов смыкания нервной трубки у плода, что подчеркивает важность питания матери для развития ребенка. Работы, направленные на изучение множества способов, которыми окружающая среда влияет на развитие, стали новым этапом в биологии развития. Так, дефицит цинка приводит к увеличению частоты гибели клеток и нарушению смыкания нервной трубки. Недостаточность по фолату может вызвать эпигенетические изменения, нарушающие формирование нервной трубки. Мы только подошли к этому новому рубежу, и перейдем через него с *вами*, новым поколением исследователей, чтобы открыть новое поле взаимоотношений между зародышем и окружающей средой.

13

Коротко

Формирование и разметка нервной трубки

1. Нервная трубка формируется путем изгибания и складывания нервной пластинки. При первичной нейруляции нейральная эктодерма складывается в трубку, которая отделяется от поверхностной эктодермы. При вторичной нейруляции эктодермальные клетки сосуществуют с мезодермальными в виде мезенхимы, чтобы сначала сформировать тяж, а затем полость (просвет) внутри его.
2. Первичную нейруляцию регулируют как внутренние, так и внешние силы. Внутренние силы, вызывающие изменения формы клеток с кубической на клиновидную, действуют в клетках шарнирных областей, изгибающих нервную пластинку. Внешние силы включают движение поверхностной эктодермы к центру зародыша.
3. Смыкание нервной трубки тоже является результатом действия внешних и внутренних сил. У человека врожденные аномалии могут быть вызваны неспособностью нервной трубки смыкаться. Фолат, который плод получает из рациона матери, чрезвычайно важен для правильного смыкания нервной трубки ребенка.
4. После того как первичный узелок достигает заднего конца тела, определенные клетки образуют параксиальную мезодерму и нервную трубку.
5. Клетки нервного гребня берут свое начало от границы между нервной трубкой и покровной эктодермой. Они оказываются между нервной трубкой и покровной эктодермой и мигрируют из этой области прочь, чтобы стать разными клеточными популяциями,

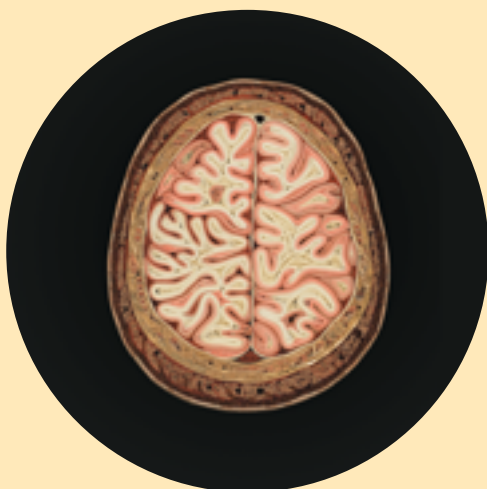
в том числе периферическими нейронами, глиальными и пигментными клетками.

6. У многих зародышей (особенно у амниот) существует градиент созревания, т. е. передние отделы развиваются раньше, чем задние.
7. Мозг позвоночных составляют три первичных мозговых пузыря: prosencephalon (передний мозг), mesencephalon (средний мозг) и rhombencephalon (задний мозг). Впоследствии prosencephalon и rhombencephalon разделяются.
8. Дорсально-вентральную разметку нервной трубки осуществляют белки суперсемейства TGF β , секретируемые поверхностной эктодермой и крышей

нервной трубки, а также белок Sonic hedgehog из хорды и дна нервной трубки. Пространственный и временной градиенты Shh запускают синтез соответствующих транскрипционных факторов, паттернирующих нейроэпителий.

9. Бипотенциальные нейромезодермальные прогениторные клетки (НМП) в хвостовом отделе тела развивающегося зародыша могут стать как нейральными клетками, так и клетками сомитов. Воздействие встречных градиентов Fgf/Wnt и ретиноевой кислоты на пренеуральные прогениторные клетки приводит к паттернированию каудальной нервной трубки по дорсально-вентральной оси.

**Сложность человечности:
как глубоки ее складки?**



С разрешения: Lisa Nilsson

«Возможно, самый интригующий вопрос из всех — посильна ли мозгу проблема его собственного возникновения?» — предположил Грегор Айхеле в 1992 г. Понимание устройства мозга — органа, который воспринимает, думает, любит, ненавидит, помнит, меняется, обманывает себя и координирует все сознательные и бессознательные телесные процессы, несомненно, самая серьезная из всех задач биологии развития. Сочетание генетических и клеточных подходов с подходами системного уровня дает нам самое приблизительное понимание того, как базовая анатомия мозга становится упорядоченной.

Дифференцировка нервной трубки в различные области головного и спинного мозга происходит одновременно тремя разными путями. На общем анатомическом уровне нервная трубка и ее просвет образуют вздутия и перетяжки, формируя мозговые пузыри и спинной мозг. На тканевом уровне популяции клеток в стенке нервной трубки организуются, закладывая различные функциональные отделы головного и спинного мозга. Наконец, на клеточном уровне нейроэпителиальные клетки дифференцируются во множество типов нервных клеток (**нейронов**) и связанных с ними клеток (**глия**), представленных в организме. В этой главе мы сконцентрируем внимание на развитии мозга млекопитающих вообще и на особенности мозга человека, которые, как мы полагаем, делают нас людьми.

Нейроанатомия развивающейся центральной нервной системы

Наш мозг содержит примерно 130–200 млрд клеток, половина из которых (около 80 млрд) — нейроны, около 60 млрд — глиальные клетки и еще около

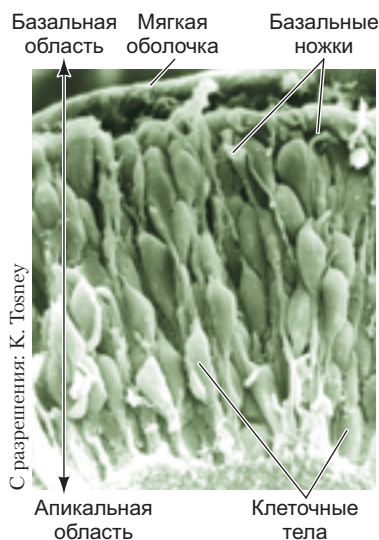


Рис. 14.1. Полярность клеток ЦНС. Полученная на сканирующем электронном микроскопе микрофотография новообразованной нервной трубки цыпленка показывает нейроэпителиальные клетки на разных стадиях клеточного цикла, расположенные по всей толщине эпителия

20 млрд, предположительно, эндотелиальные клетки (Azevedo et al., 2009; Andrade-Moraes et al., 2013; von Bartheld et al., 2016; von Bartheld, 2018). Известно множество *типов* нейронов и глиальных клеток, от сравнительно мелких (зернистые клетки) до огромных (нейроны Пуркинье). Все разнообразие клеточных типов происходит от мультипотентных нейроэпителиальных клеток нервной трубки.

Клетки развивающейся центральной нервной системы

Нейроэпителиальные клетки образуют нервную пластинку и раннюю нервную трубку и, как клетки эпителия, поляризованы вдоль своей апикально-базальной оси (**рис. 14.1**). Когда нервная пластинка замыкается в нервную трубку, апикальная поверхность нейроэпителия обращена к ее просвету, который заполняется спинномозговой жидкостью. Базальная поверхность каждой клетки венчается **ножкой**, или выпячиванием, базальной мембраны на внешнюю поверхность нервной трубки. Поверхность ЦНС называют мягкой оболочкой, вслед за *Pia mater* — мягкой оболочкой головного мозга, представляющей собой волокнистые мембраны, окружающие нервные ткани.

НЕЙРАЛЬНЫЕ СТЕВЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЭМБРИОНА

Нейроэпителиальные клетки являются первыми мультипотентными нейральными стволовыми клетками эмбриона. Как стволовые клетки они обладают

высоким пролиферативным потенциалом, генерируя клетки-предшественники первых нейрональных и глиальных клеточных типов нервной трубки (Turner and Cepko, 1987).

Нейроэпителиальные клетки можно обнаружить только на ранних эмбриональных стадиях, затем они превращаются в **вентрикулярные клетки (эпендимные клетки)** и **клетки радиальной глии**. Эпендимные клетки остаются интегральной частью выстилки нервной трубки и секретируют спинномозговую жидкость. Клетки радиальной глии сохраняют поляризованное строение, протягиваясь вдоль апикально-базальной оси ЦНС и выполняют две основные функции. Во-первых, они служат главными нейральными стволовыми клетками на протяжении эмбрионального и фетального развития, демонстрируя самообновление и мультипотентную генерацию нейронов и глиальных клеток (Doetsch et al., 1999; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009), и, во-вторых, они служат направляющими миграции других клеток-предшественников и новообразованных нейронов (Bentivoglio and Mazzeo, 1999). Эти две функции составляют основу механизма, управляющего ростом мозга.



Загадки развития

Глия больше, чем просто клей? Современный интерес к функциям глиальных клеток позволил выявить их разнообразное влияние на физиологию нервной системы, но как функции глии проявляют себя в развитии ЦНС, остается неизвестным. Попробуйте ответить на такие вопросы: необходимы ли оболочки из олигодендроцитов для выживания нейронов? Регулируют ли клетки астроглии выбор синаптических партнеров? Помогает ли микроглия формообразованию при развитии мозга?

Ткани развивающейся центральной нервной системы

Нейроны мозга организуются в слои (ламинаы) и кластеры (ядра), обладающие различными функциями и связями. Изначально нервная трубка образована зародышевым нейроэпителием, слоем быстро делящихся нейральных стволовых клеток толщиной в одну клетку. Накопившиеся в ходе эволюции адаптации привели к возможности формирования зародышевым нейроэпителием сложных отделов ЦНС. Впрочем, эти отделы сохраняют базовое трехслойное строение: вентрикулярная (ближайшая к просвету) зона, мантия (промежуточная зона) и маргинальная (краевая) зона (**рис. 14.2**).

Формирование трех слоев начинается, когда клетки в **вентрикулярной зоне** продолжают делиться, мигрирующие клетки формируют второй слой вокруг исходной нервной трубки. Он утолщается,

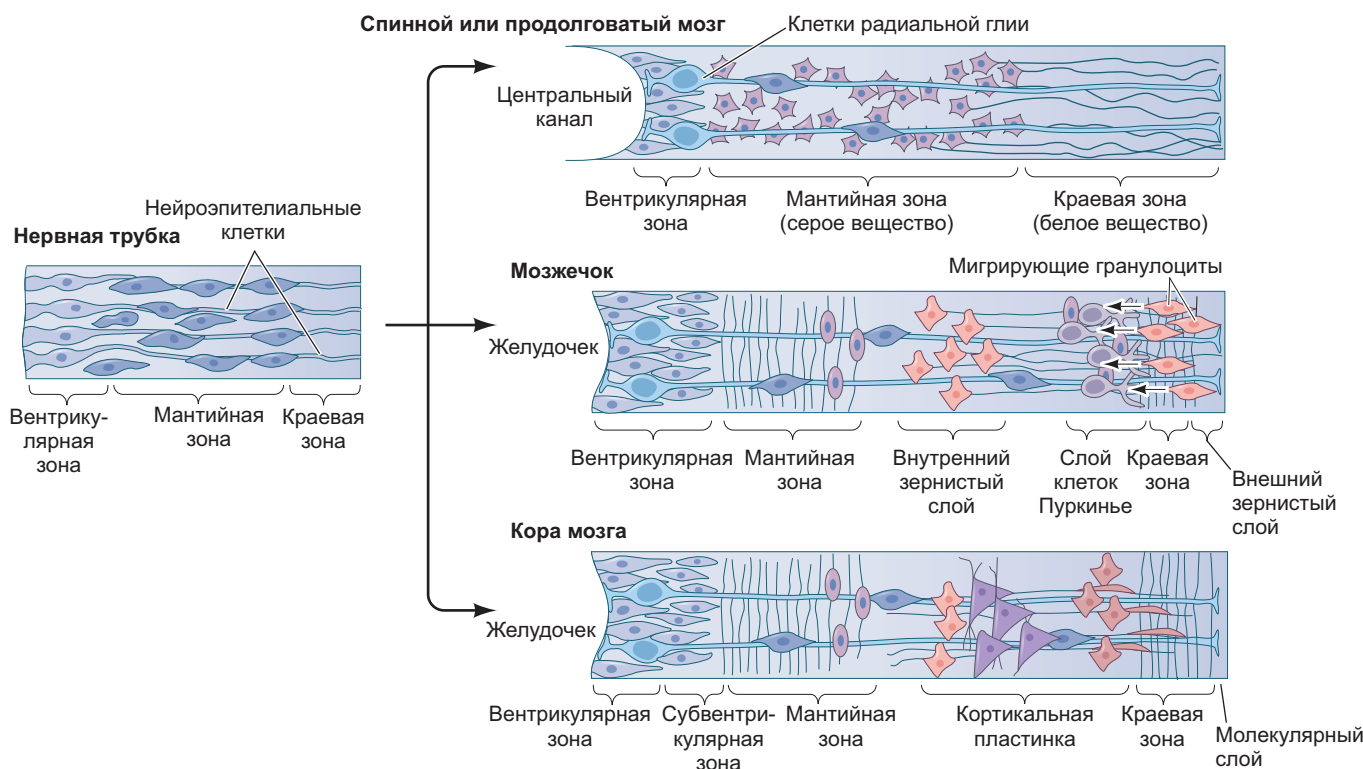


Рис. 14.2. Дифференцировка клеток стенки нервной трубки. На срезе пятидневной нервной трубки человека (слева) показаны три зоны: вентрикулярная (эпендимная), промежуточная (мантийная) и маргинальная (краевая). В спинном и продолговатом мозге вентрикулярная зона остается единственным источником нейронов и глии. В мозжечке (посередине справа) на противоположной стороне от вентрикулярной зоны формируется вторая зона деления, внешний зернистый слой. Тип нейронов, известный как зернистые клетки, мигрирует из этого слоя назад в промежуточную зону, где формирует внутренний зернистый слой. В коре головного мозга (внизу справа) мигрирующие нейроны и глиобласты формируют кортикальную пластинку из шести слоев. (По данным: M. Jakobson, 1978. *Developmental Neurobiology*. Springer: Boston MA)

по мере того как новые клетки мигрируют в него из зародышевого нейроэпителия. Этот новый слой называют **мантией** или **промежуточной зоной**. Его клетки дифференцируются, становясь нейронами и глией. Нейроны устанавливают контакты между собой, и их аксоны растут в направлении от просвета, создавая тем самым **маргинальную**, или краевую, зону, в которой мало нейрональных клеточных тел. Со временем олигодендроциты покрывают большинство аксонов в краевой зоне миелиновыми оболочками, что придает аксонам белесую окраску. В связи с этим маргинальный слой часто называют белым веществом, в то время как мантийная зона, содержащая клеточные тела, известна как серое вещество (см. рис. 14.2). Зародышевый эпителий вентрикулярной зоны впоследствии сжимается, формируя эпендиму, выстилающую мозговую полость.

Далее в главе мы рассмотрим архитектуру спинного мозга, продолговатого мозга, мозжечка и переднего мозга.

ОРГАНИЗАЦИЯ СПИННОГО И ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА

Основной трехслойный паттерн из вентрикулярного (эпендимного), мантийного и краевого слоев сохраняется в течение развития спинного мозга и моста (концевого отдела заднего мозга). На поперечном срезе мантия постепенно приобретает форму бабочки, окруженной краевой зоной или белым веществом, и обе зоны окружены соединительной тканью. По мере созревания нервной трубки продольная **пограничная борозда** (*sulcus limitans*) делит ее на дорсальную и вентральную части. Дорсальная часть получает сигналы от сенсорных нейронов, тогда как вентральная служит эффектором различных моторных функций (рис. 14.3). Это анатомическое развитие определяет основы физиологии продолговатого и спинного мозга (такие как рефлекторная дуга).

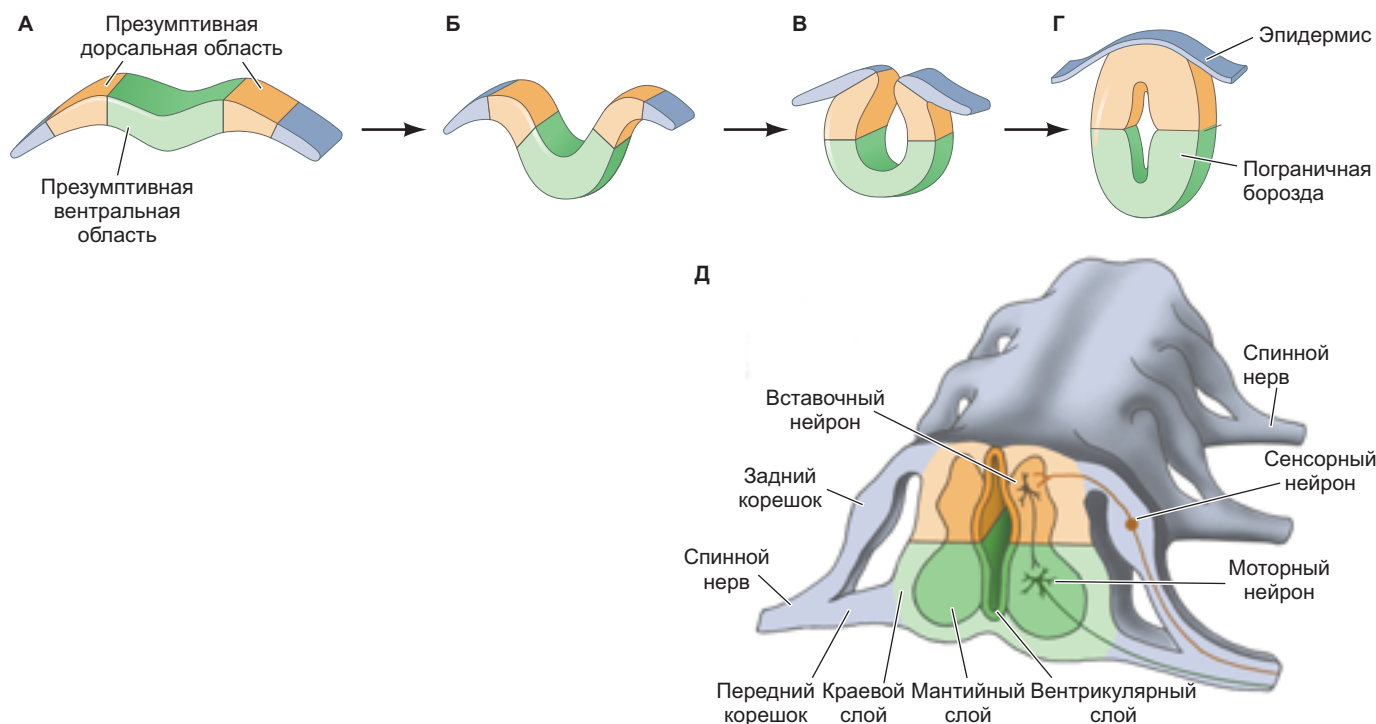


Рис. 14.3. Развитие спинного мозга человека. А–Г. Нервная трубка функционально делится на дорсальную и вентральную части, разделенные пограничной бороздой. По мере того как окружающие сомиты формируют позвонки нервная трубка дифференцируется на вентрикулярную (эпендимную), мантийную и маргинальную зоны, а также пластинки дна и крыши. Пограничная борозда отделяет дорсальную (крыловидную; показана *желтым*) часть спинного мозга, получающую информацию из вентральной (базальной, показана *зеленым*) части спинномозгового ствола, из которой исходят мотонейроны. Д. Сегмент спинномозгового ствола с его сенсорными (дорсальными) и моторными (вентральными) корешками. (По данным: W. J. Larsen, 1993. *Human Embryology*. Churchill Livingstone: New York.)

ОРГАНИЗАЦИЯ МОЗЖЕЧКА

В мозжечке клеточные миграции, селективная пролиферация клеток и клеточная смерть вызывают модификацию трехслойной структуры, представленной на рис. 14.2. Развитие мозжечка производит сильно складчатую кору (внешний отдел), сложенную из клеток Пуркинье. Клетки Пуркинье контролируют функции поддержания равновесия и передают информацию из коры мозжечка в другие отделы мозга. Критичной представляется миграция предшественников нейронов к внешней поверхности развивающегося мозжечка. Здесь они формируют новую зародышевую зону (**наружный зернистый слой**) рядом с внешней границей нервной трубки.

На внешней границе внешнего зернистого слоя, который состоит из одного-двух слоев клеток, нейральные клетки-предшественники делятся и контактируют с клетками, производящими морфогенетические белки кости (ВМР). ВМР направляют дифференцировку постмитотических дочерних клеток нейральных предшественников в тип нейронов, называемый **зернистыми клетками** (Alder et al. 1999). Зернистые клетки мигрируют обратно в вентрику-

лярную (эпендимную) зону, где формируют **внутренний зернистый слой** (см. рис. 14.2). В это время вентрикулярная зона мозжечка генерирует большое разнообразие нейронов и глиальных клеток, включая отличающиеся от других нейронов крупные **клетки Пуркинье**, основной тип клеток мозжечка (**рис. 14.4**). Нейроны Пуркинье секретируют Sonic hedgehog, который поддерживает деление предшественников зернистых клеток во внешнем зернистом слое (Wallace, 1999). Каждый нейрон Пуркинье имеет огромное **дендритное разветвление** древовидной формы над грушевидным клеточным телом. Обычный нейрон Пуркинье может формировать до 100 000 синапсов с другими нейронами — больше чем любой другой изученный тип нейронов. К тому же, каждый нейрон Пуркинье имеет тонкий аксон, соединяющий его с нейронами в глубоком ядре мозжечка.

Нейроны Пуркинье составляют ключевую часть электросигнальной сети мозжечка. Все электрические импульсы сказываются на их активности, поскольку нейроны Пуркинье — единственные клетки мозжечковой коры, выводящие сигналы из мозжечка. Такое управление способствует тому, что клетки нужных типов дифференцируются в определенном

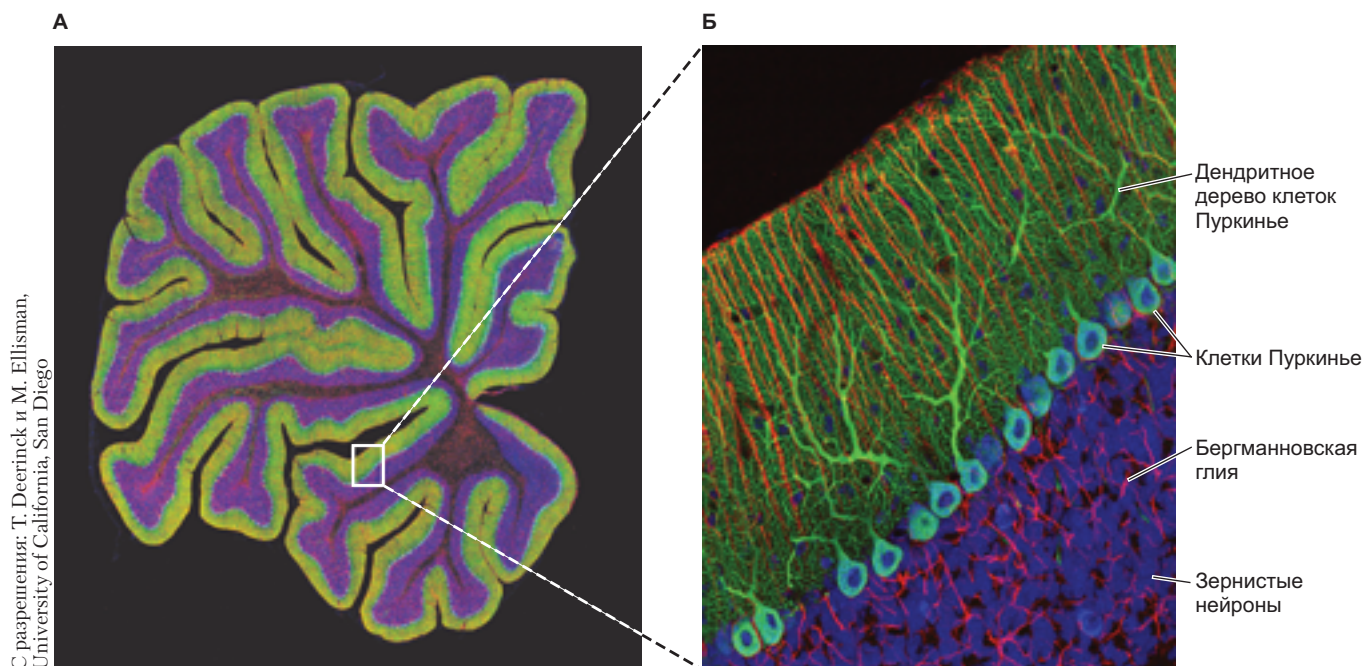


Рис. 14.4. Организация мозжечка. **А.** Сагиттальный срез флуоресцентно меченного мозжечка крысы, полученный с помощью двухфотонной конфокальной микроскопии. **Б.** Увеличенная обведенная зона из (А) показывает высокоструктурированную организацию нейронов и глиальных клеток. Клетки Пуркинье показаны голубым, отростки — ярко-зеленым, Бергманновская глия — красным, зернистые клетки — синим

месте и времени. *Как осуществляется такая сложная последовательность событий?* Рассмотрим несколько идей о механизмах, которые могут контролировать паттерн нейрональной дифференцировки, прежде чем вернуться к этому важному вопросу.

СТРОЕНИЕ КОНЕЧНОГО МОЗГА

Трехслойное строение нервной трубки с некоторыми особенностями обнаруживается и в конечном мозге. Конечный мозг, который часто называют корой головного мозга, организуется двумя путями. Во-первых, как и мозжечок, он образован радиально из взаимодействующих слоев. Определенные нейральные клетки-предшественники из мантийного слоя мигрируют по отросткам радиальной глии в направлении внешней поверхности мозга, где собираются в кортикальную пластинку (см. рис. 14.2). Этот новый слой серого вещества превращается в **неокортекс**, отличительную особенность строения мозга млекопитающих. Обособление неокортекса происходит при участии транскрипционного фактора Lhx2, активирующего множество других специфичных для мозга генов. У мышей с нокаутированным Lhx2 кора головного мозга не формируется (рис. 14.5; Mangale et al., 2008; Chou et al., 2009).

Неокортекс затем расслаивается на шесть слоев, состоящих из клеточных тел нейронов; взрослые

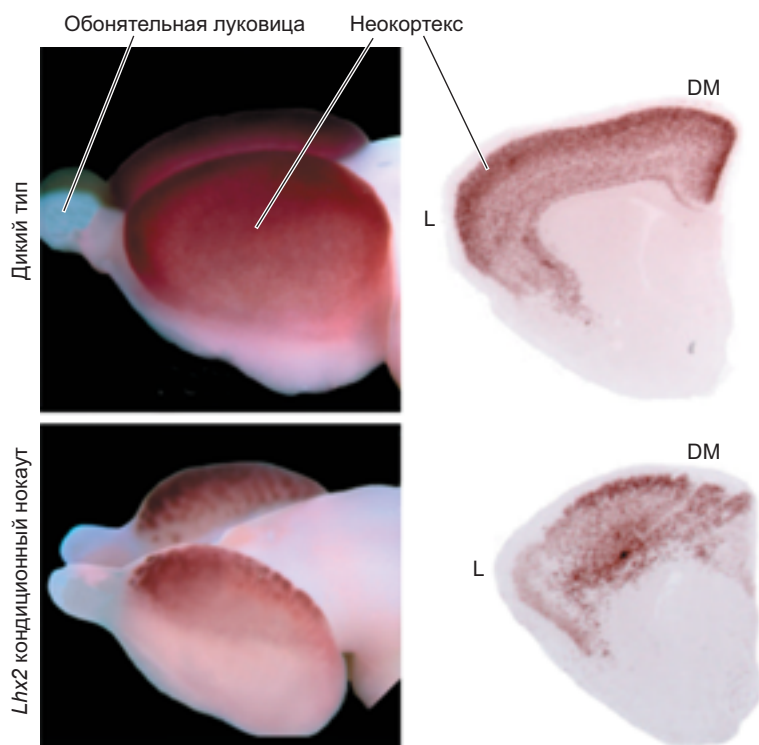
формы слоев окончательно созревают в середине детства. Каждый слой отличается от остальных своими функциональными качествами, типами нейронов, образующих его, и связями, которые они устанавливают (рис. 14.6). Например, нейроны четвертого кортикального слоя получают входные сигналы из таламуса (отдела, в котором формируется промежуточный мозг), а нейроны шестого кортикального слоя посылают свои основные выходные сигналы в таламус.

В дополнение к шести вертикально расположенным слоям кора мозга горизонтально разбита более чем на 40 отделов, регулирующих анатомически и функционально различные процессы. Например, нейроны зрительной коры шестого слоя посылают свои аксоны в латеральное коленчатое тело таламуса, обеспечивающее зрение, в то время как нейроны слуховой коры шестого слоя, расположенные впереди от зрительной коры, формируют свои аксоны в сторону медиального коленчатого тела, ответственного за слух.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ОРГАНИЗАЦИЯ МОЗГА ВЗРОСЛОГО ПРЕДОПРЕДЕЛЕНА В ЭМБРИОНАЛЬНОМ МОЗГЕ

Один из главных вопросов нейробиологии развития в том, предопределены ли будущие функциональные отделы мозга изначально в вентрикулярной зоне, или они размечаются позже в ходе



Из: S.-J. Chou et al., 2009, *Nat. Neurosci* 12: 1381–1389

Рис. 14.5. Lhx2 требуется для развития неокортекса. Тотальный препарат и коронарные срезы мозга мыши дикого типа и с нокаутированным Lhx2, где он отсутствует в ранних стволовых клетках. Неокортексный маркер Satb2 (*коричневый*) демонстрирует высокую экспрессию в дорсально-медиальной (DM) и латеральной (L) областях неокортекса у мыши дикого типа, в то время как у Lhx2-нокаутированной мыши заметная экспрессия Satb2 обнаруживается только в дорсально-медиальном неокортексе

развития синаптическими контактами между нейронами разных отделов. Предположить о существовании ранней разметки мозга (т. е. его «изначальной карты») позволяют известные мутации у людей, блокирующие выстраивание слоев и нормальные функции только в определенной части

мозга, не затрагивая соседние (Piao et al., 2004). Более очевидное свидетельство существования ранней разметки эмбриональной коры получили Фуэнтеальба с коллегами в 2015 г., когда отслеживали движение вентрикулярных глиальных клеток из разных отделов эмбрионального мозга

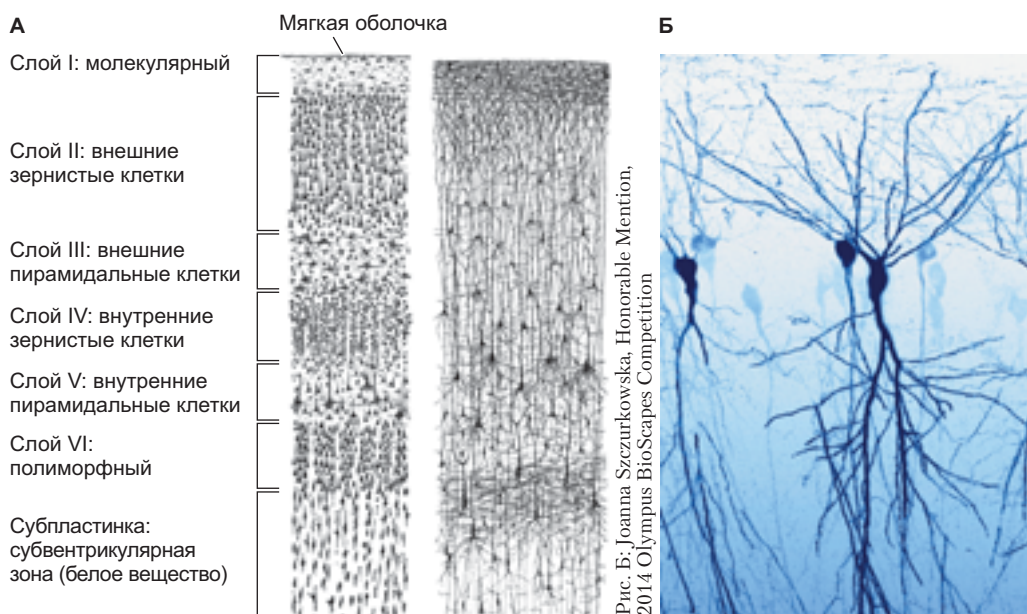


Рис. Б: Joanna Szczurkowska, Honorable Mention, 2014 Olympus BioScares Competition

Рис. 14.6. Различные типы нейронных клеток организованы в шесть слоев неокортекса. **А.** Определенные клеточные красители выявляют расслоение неокортекса в этих исключительных рисунках Сантьяго Рамона-и-Кахаля из его работы 1899 г. «Comparative study of the sensory areas of the human cortex». **Б.** Пирамидальные нейроны гиппокампуса мыши (седьмой день после рождения)

мышы, используя ретровирусное штрихкодирование, вплоть до прямых клональных потомков клеток во взрослой коре (рис. 14.7). Они обнаружили, что дифференцированные нейроны коры происходили от стволовых клеток из сравнимых по очертаниям зон эмбриональной коры (которые сами формировались из клеток радиальной глии из схожих регионов вентрикулярной зоны). Эти результаты согласуются с моделью, согласно которой радиальная глия вентрикулярной зоны эмбриона регионально размечена и порождает сходно специфицированные зрелые стволовые клетки, в свою очередь дающие специфичное для каждого участка потомство.

Механизмы развития, регулирующие рост мозга

Рост мозга позвоночных во многом похож на строительство многоэтажного разноцветного кирпичного здания. Во-первых, нужно сделать кирпичи и доставить нужное число кирпичей подходящего цвета в определенное место. Во-вторых, для доставки кирпичей и стройматериалов туда, где они нужны, необходимы леса. Здание строится от фундамента до крыши, по мере движения вширь во всех измерениях, архитектура усложняется. В развивающемся мозге точно отрегулированное деление стволовых клеток и клеток-предшественников производит необходимое число клеток определенных типов («кирпичей»). Клетки радиальной глии не только служат стволовыми клетками, но и образуют леса, необходимые для движения клеток-предшественников и новообразованных нейронов во все более близкие к поверхности слои таким образом, что в результате мозг строится изнутри наружу.

Поведение нейральных стволовых клеток во время деления

ИНТЕРКИНЕТИЧЕСКИЕ ЯДЕРНЫЕ МИГРАЦИИ ВО ВРЕМЯ ДЕЛЕНИЯ

Исследование зародышевого нейроэпителия не только показало, что клетки распространяются на всю его толщину, но и выявило, что *клеточные ядра* расположены на разной высоте в этой ткани (см. рис. 14.1), а также, что ядра двигаются по мере того, как клетка проходит фазы клеточного цикла (Sauer et al., 1935 г.). Во время синтеза ДНК (S-фаза клеточного цикла) ядро находится вблизи базального полюса клетки у внешнего края нервной трубки и перемещается в сторону апикального полюса синхронно с клеточным циклом. Во время

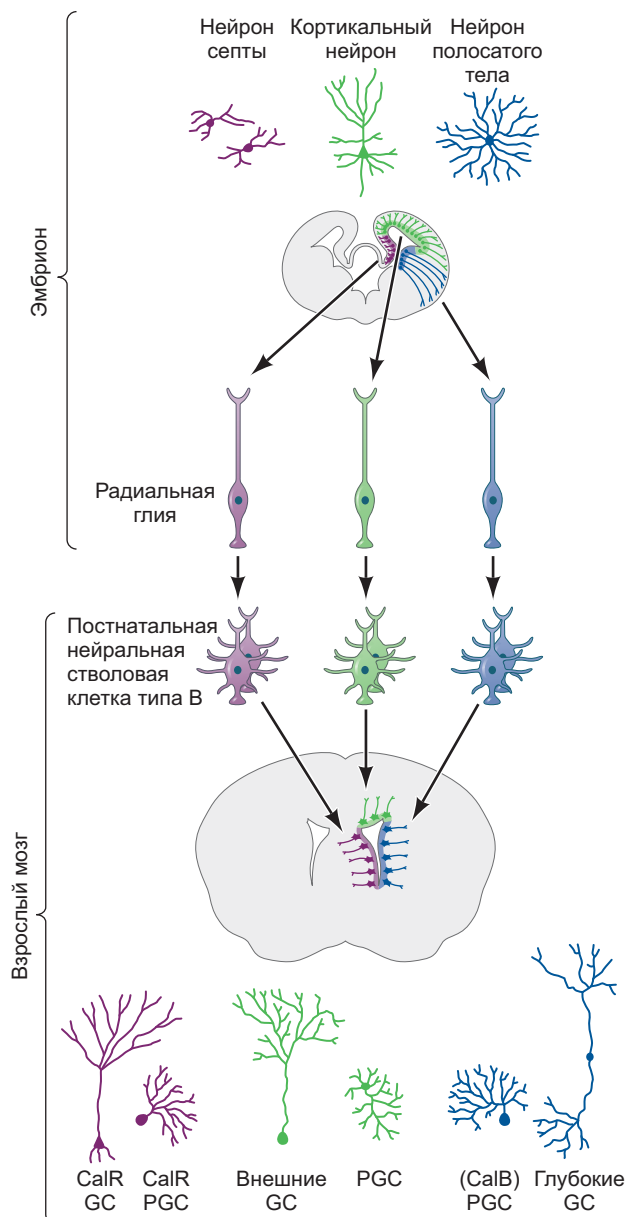
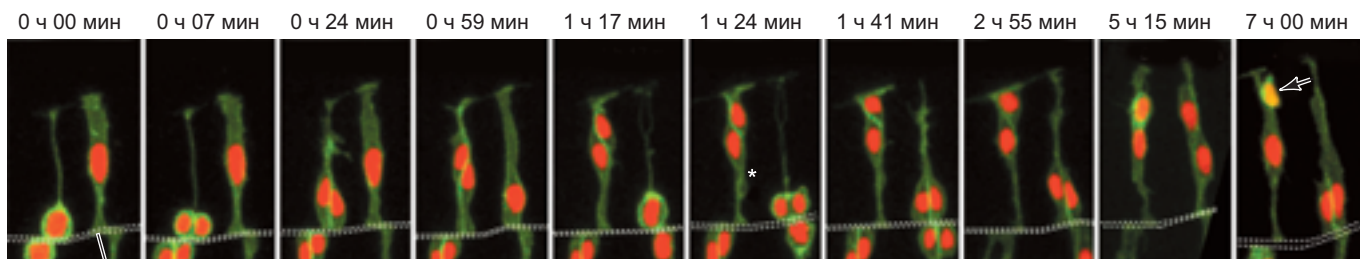


Рис. 14.7. Региональная спецификация эмбриональной радиальной глии обеспечивает ограничение проспективных путей развития производимых ею клеток-предшественников. На схеме показаны расположение вентрикулярной глии в развивающемся мозге (*наверху*), клональное происхождение стволовых клеток типа В и связанных с ними дифференцированных нейронов в зрелом мозге (*внизу*). GC — зернистые клетки; PGC — перигломерулярные клетки; CalB — кальбиндин; CalR — кальретицин. (По данным: L. C. Fuentealba et al., 2015. *Cell* 161: 1644–1655.)

митоза (М-фаза) ядро находится на апикальном полюсе клетки рядом с вентрикулярной поверхностью. В постмитотической G₁-фазе ядро медленно возвращается к базальному полюсу (рис. 14.8). Этот процесс называют **интеркинетической ядерной миграцией**, он обнаруживается также в клетках ра-



Апикальная поверхность

Из: P. Alexandre et al., 2010.
Nat Neurosci 13: 673–679

Рис. 14.8. Прижизненная съемка интеркинетических миграций ядер и делений нейральных стволовых клеток в эмбриональном заднем мозге *Danio rerio*. Две соседние клетки-предшественники в зародышевом эпителии снимали в течение более 7 ч. Мембраны клеток окрашены зеленым, а ядра — красным. Репортерный ген специфично маркирует нейроны желтым. Клетка-предшественник слева прошла асимметричное деление, производя нейрон (стрелка на 7 ч) и другую клетку-предшественник (под нейроном). Клетка справа прошла симметричное деление, породив две клетки-предшественника. Звездочка на 1 ч 24 мин показывает точку, в которой нейрональная дочерняя клетка отрывается от апикальной поверхности (показанной двойной линией белых точек). Обратите внимание на транслокацию ядра в клетке-предшественнике в ходе ее клеточного цикла. Клетка синтезирует ДНК (S-фаза), когда ее ядро находится у базального полюса (вдали от линий из точек), и проходит митоз (M-фаза), когда ядро вблизи апикального полюса

диальной глии и описан для многих позвоночных (Alexandre et al., 2010; Meyer et al., 2011; Spear and Erickson, 2012). Механизмы этого процесса не вполне понятны, но скорее всего в нем задействованы микротрубочки и моторные белки. В случае мутации гена моторного белка, участвующего в расхождении полюсов митотического веретена у *Danio rerio*, в клетках радиальной глии успешно начинается интеркинетическая ядерная миграция, но останавливается, так что клеточные тела со временем собираются на (апикальной) поверхности просвета (Johnson et al., 2016).

СИММЕТРИЯ ДЕЛЕНИЯ

Какие есть возможности у делящихся нейроэпителиальных клеток или клеток радиальной глии? Вспомним приведенное в гл. 5 описание деления других стволовых клеток (см. рис. 5.1). Стволовая клетка может поделиться симметрично, производя две копии себя, тем самым увеличивая пул стволовых клеток. В другом случае симметричное деление порождает две дифференцирующиеся дочерние клетки, что обедняет пул стволовых клеток. Стволовая клетка может также поделиться асимметрично, производя стволовую и дифференцирующуюся дочерние клетки.

Как мы можем понять, что происходит в нейроэпителии? Отслеживать клеточные линии нам позволит мечение клеток меткой, такой как радиоактивный тимидин, который встраивается только в делящиеся клетки. При мечении таким образом эмбрионального нейроэпителия у млекопитающих

на ранних стадиях развития 100% клеток включают меченый тимидин в свою ДНК, и это означает, что все клетки находятся на той или иной стадии клеточного деления (Fujita, 1964). Однако вскоре после этого часть клеток перестают включать аналог тимидина, что показывает, что они перестали делиться. Эти клетки мигрируют от оболочки нервной трубки и дифференцируются в нейроны и глиальные клетки (Fujita, 1966; Jacobson, 1968). Когда клетка зародышевого нейроэпителия готова произвести нейрон вместо новых стволовых клеток, плоскость деления часто смещается, что обуславливает асимметричное деление (стрелка на рис. 14.8). Клетка, сохраняющая связь с оболочкой, обычно остается стволовой, в то время как другая клетка мигрирует и дифференцируется в нейрон или следующий тип клетки-предшественника (Chenn and McConnell, 1995; Hollyday, 2001).



Загадки развития

Говорят, что картина стоит тысячи слов, это значит, что фильм должен стоить миллион. Когда вы смотрите фильмы, демонстрирующие интеркинетические миграции ядер, трудно не замечать что-то новое каждый раз. В таких фильмах можно найти ответы на множество вопросов: Почему цитокinesis должен происходить у апикальной поверхности нейроэпителия? Сохраняют ли эти клетки свои базальные отростки? Какую роль в ядерной миграции играют centrosomes — ключевые структуры, вокруг которых организуются микротрубочки при митозе?

Нейрогенез: стройка снизу вверх (или изнутри наружу)

В статье 2008 г. Николас Гайано (Nicholas Gaiano) описывает нейрогенез так:

Образование неокортекса млекопитающих, наверное, самый сложный биологический процесс в природе. Пул кажущихся гомогенными стволовых клеток сначала разрастается и диверсифицируется, а потом начинает производить следующие друг за другом волны нейронов. По мере своего появления нейроны расселяются в зарождающейся кортикальной пластинке, где они встраиваются в развивающуюся сеть контактов неокортекса. Пространственная и временная координация производства нейронов, их миграция и дифференцировка тонко регулируются и имеют огромное значение для возникновения зрелого мозга, способного обрабатывать сенсорные сигналы извне, реагировать на них и осознанно думать.

По мере созревания нервной трубки потомство нейроэпителиальных стволовых клеток становится радиальными глиальными клетками. Лишь сравнительно недавно исследования клеточных линий показали, что радиальная глия — это нервные ство-

ловые клетки, которые проходят симметричные и асимметричные деления. (Malatesta et al., 2000, 2003; Miyata et al., 2001; Noctor et al., 2001; Anthony et al., 2004; Casper and McCarthy 2006; Johnson et al. 2016). Деление радиальной глии происходит в вентрикулярной зоне, ограничивающей просвет нервной трубки, контактирующей со спинномозговой жидкостью. В конечном мозге по мере того как клетки-предшественники расслаиваются от вентрикулярной зоны, они формируют **субвентрикулярную зону** в базальном направлении от нее. Вместе эти зоны формируют зародышевый слой, производящий нейроны, которые мигрируют в кортикальную пластинку и формируют слои нейронов неокортекса (рис. 14.9А, Б; Frantz et al., 1994; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Lui et al., 2011; Kwan et al., 2012; Paridaen and Huttner, 2014).

Одиночная стволовая клетка вентрикулярного слоя может произвести нейроны и глиальные клетки в каждом из кортикальных слоев (Waksh and Cepko, 1988). Есть три основных предшествующих клеточных типа в герминальном слое человека: **вентрикулярная радиальная глия (vRG), внешняя**

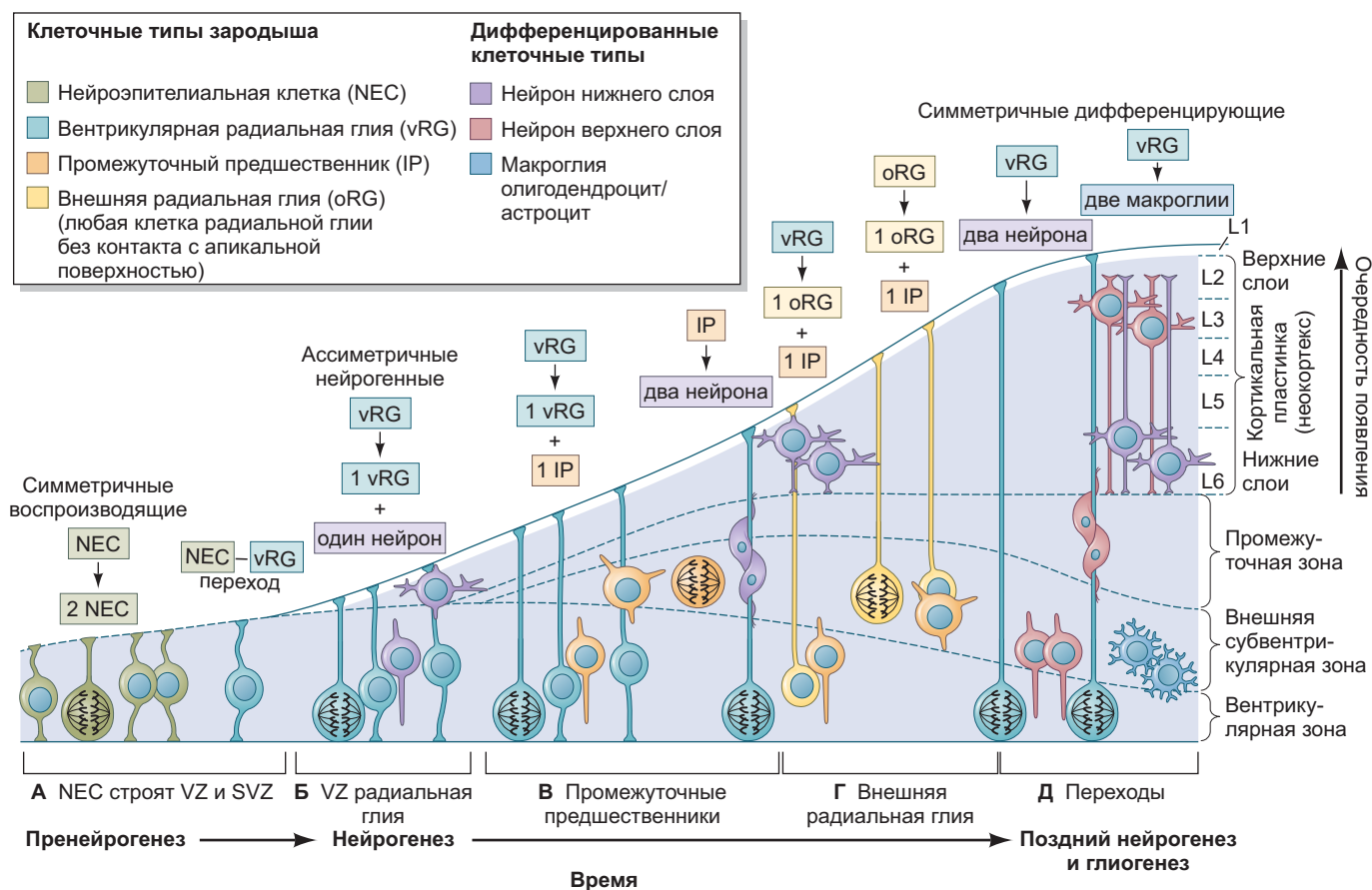


Рис. 14.9. Сводная модель нейрогенеза в коре мозга. SVZ — субвентрикулярная зона; VZ — вентрикулярная зона. (По данным: A. Kriegstein and A. Alvarez-Buylla, 2009. *Annu Rev Neurosci* 32: 149–184; K. Y. Kwan et al., 2012. *Development* 139: 1535–1546; J. T. Pridaen and W. B. Huttner, 2014. *EMBO Rep* 15 351–364.)

радиальная глия (oRG) и промежуточные клетки-предшественники (IP). На ранних стадиях развития ЦНС нейроэпителиальные клетки становятся вентрикулярной радиальной глией, которая, как следует из ее названия, контактирует с поверхностью внешней оболочки. vRG становится родительским типом стволовых клеток и кроме прямо дифференцирующихся нейронов порождает oRG и IP-клетки (рис. 14.9В–Д). На ранних стадиях нейrogenеза преобладает самообновление путем симметричных делений, увеличивающее пул клеток-предшественников, а затем асимметричные деления преобладают на стадии дифференцировки предшественников.

Глия как матрикс для мозжечка и неокортекса

Различные типы нейронов и глиальных клеток появляются в разное время. Маркирование клеток в отдельные моменты развития мозга показывает, что клетки, родившиеся на более ранних стадиях, мигрируют ближе всего; клетки, родившиеся позже, мигрируют дальше, формируя приповерхностные отделы коры мозга. Последующая дифференцировка зависит от положения, которое они занимают вне зародышевого нейроэпителия (Letourneau, 1977; Jacobson, 1991). Какими развитием механизмами устанавливается сопряжение момента рождения нейронов с их дифференцировкой вдоль апикально-базальной оси мозга?

Известно, что клетки радиальной глии направляют миграцию нейронных предшественников из внутренней (просветной) области в сторону внешних зон ЦНС (Rakic, 1971). Таким образом клетки-предшественники, происходящие от клеток радиальной глии, тоже используют контакты своих сестринских клеток между просветной и внешней поверхностями для миграции к своим локациям. Далее мы исследуем механизмы миграций, направляемых клетками радиальной глии в мозжечке и конечном мозге.

РАДИАЛЬНАЯ ГЛИЯ В НЕОКОРТЕКСЕ

В развивающемся мозжечке большинство нейронов, появляясь в вентрикулярной зоне, мигрирует наружу вдоль отростков клеток радиальной глии, формируя **кортикальную пластинку** вблизи внешней поверхности мозга, где они выстраивают шесть слоев неокортекса. Как и в остальном мозге, нейроны, появившиеся раньше прочих, формируют самый близкий к вентрикулярной зоне слой (рис. 14.10А, Б). Более молодые нейроны мигрируют дальше, формируя слои коры, расположенные ближе к поверхности. Этот процесс формирует градиент в развитии «изнутри наружу» (Rakic, 1974). Было показано, что детерминация ламинарной идентичности (т. е.

в какой слой клетка мигрирует) происходит при последнем клеточном делении (McConnell, Kaznowski, 1991). Новообразованные предшественники нейронов из молодого мозга, которые там формировали бы шестой слой, пересаженные в мозг старшего возраста, где мигрирующие предшественники нейронов формируют второй слой, следуют предопределенному пути и мигрируют только в шестой слой. Однако если эти клетки трансплантированы до последнего деления, например в середине S-фазы, то их принадлежность еще не предопределена и они мигрируют во второй слой (рис. 14.10В, Г). Судьбы предшественников нейронов в мозге более старшего возраста предопределены более жестко. Нейронные предшественники, сформировавшиеся на ранних этапах развития, могут формировать все типы нейронов, по крайней мере для слоев 2–6; более поздние предшественники нейронов порождают только нейроны верхних слоев (слой 2) (Frantz and McConnell, 1996). Считается, что, когда клетки достигают своего окончательного местоположения, они экспрессируют специфичные молекулы адгезии, позволяющие им формировать мозговые ядра (Matsunami and Takeichi, 1995).

Сигнальные механизмы, регулирующие развитие неокортекса

Как мигрирующие нейронные предшественники расходятся для выравнивания слоя? Как сказано выше, старшие по возрасту нейроны формируют более глубокие слои неокортекса, нейроны, появившиеся позже, формируют слои, расположенные выше. *Подумайте об этом.* Это значит, что мозг растет изнутри наружу. При таком росте каждый следующий отрастающий слой отодвигает внешнюю границу и нейроны, отправляющиеся к своим предназначенным местам расположения, должны пройти больший путь, чем их предшественники. Эта важная динамика в конечном счете влияет на формирование слоев мозга (см. Frotscher, 2010).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

КЛЕТКИ КАХАЛЯ–РЕТЦИУСА: «ДВИЖУЩИЕСЯ МИШЕНИ» В НЕОКОРТЕКСЕ

Когда поверхность просвета нервной трубки и мягкая оболочка достаточно близки друг к другу во время раннего развития неокортекса, новорожденный нейрон распространяет базальные филоподии до мягкой оболочки, устанавливает с ней адгезивный контакт, а потом просто сдвигает ядро и окружающую цитоплазму в сторону мягкой оболочки, перемещая тем самым тело клетки из апикальной в базальную область. Базальное соединение

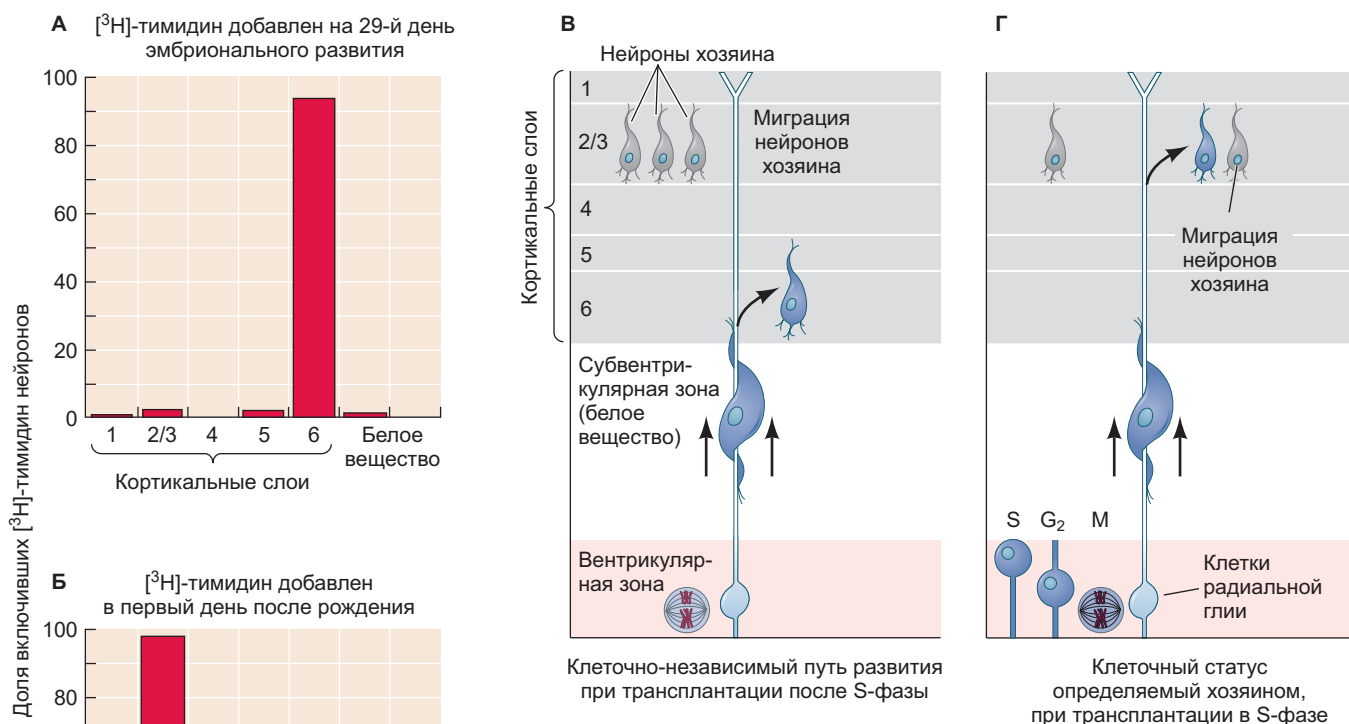


Рис. 14.10. Детерминация кортикальной ламинарной идентичности в мозге хорька. **А.** «Ранние» нейронные предшественники (родились на 29-й день эмбрионального развития) мигрируют в слой 6. **Б.** «Поздние» нейронные предшественники (родились в первый день постнатального развития) мигрируют дальше, в слои 2 и 3. **В.** Когда ранние нейронные предшественники (показаны синим) трансплантируются в вентрикулярную зону более старшего возраста после их последней митотической S-фазы, формирующиеся из них нейроны мигрируют в слой 6. **Г.** Если предшественники трансплантированы до или во время их последней S-фазы, то формирующиеся из них нейроны мигрируют в слой 2. (По данным: S. K. McConnell and C. E. Kaznowski, 1991. *Science* 254: 282–285.)

обеспечивает физическое сопротивление и напряжение, необходимые для передвижения (Miyata and Ogawa, 2007). Таким образом, никакой клеточной миграции для этого не нужно. В более позднем развитии каждая клетка-предшественник должна активно мигрировать по отросткам клеток радиальной глии, до тех пор пока ее базальная мембрана контактирует с самым внешним краем кортикальной пластинки, где перемещение клетки заканчивается (рис. 14.11А).

На эту миграцию вовне влияют **клетки Кахаля–Ретциуса**, находящиеся под мягкой оболочкой и секретирующие Reelin, который регулирует формирование слоев мозжечка (D’Arcangelo et al., 1995, 1997). Мигрирующие клетки-предшественники экспрессируют трансмембранные рецепторы к Reelin (Trommsdorff et al., 1999), и, когда рецепторы его связывают, они активируют ряд сигнальных путей с участием Disabled-1 (см. рис. 14.11, клетка 1). В результате в клетках растёт экспрессия N-кадгерина, что позволяет им соединяться с другими клетками, тоже его экспрессирующими.

Кадгеринины продуцируются с растущей интенсивностью по мере удаления от вентрикулярной зоны, достигают максимума интенсивности экспрессии в маргинальной зоне, включая местоположение клеток Кахаля–Ретциуса; таким образом, новорожденные нейроны, экспрессирующие N-кадгеринины, направляются в области большей адгезии (Franco et al., 2011; Jossin and Cooper, 2011). Нейроны протягивают филоподии к богатому фибронектином внеклеточному матриксу мягкой оболочки (Chai et al., 2009) и используют трансмембранные белки интегрины для прикрепления филоподий к нему (Sekine et al., 2012). Когда филоподии прикреплены, Disabled-1-опосредованная регуляция актинового цитоскелета запускает контракцию филоподий наподобие пружин, так что клеточное тело вытаскивается вперед, когда апикальный полюс клетки теряет соединение (см. рис. 14.11А, клетка 2; Miyata and Ogawa, 2007).

Тот же самый сигнал Reelin, запускающий миграцию, включает и негативную обратную связь, поэтому при самых высоких концентрациях Reelin

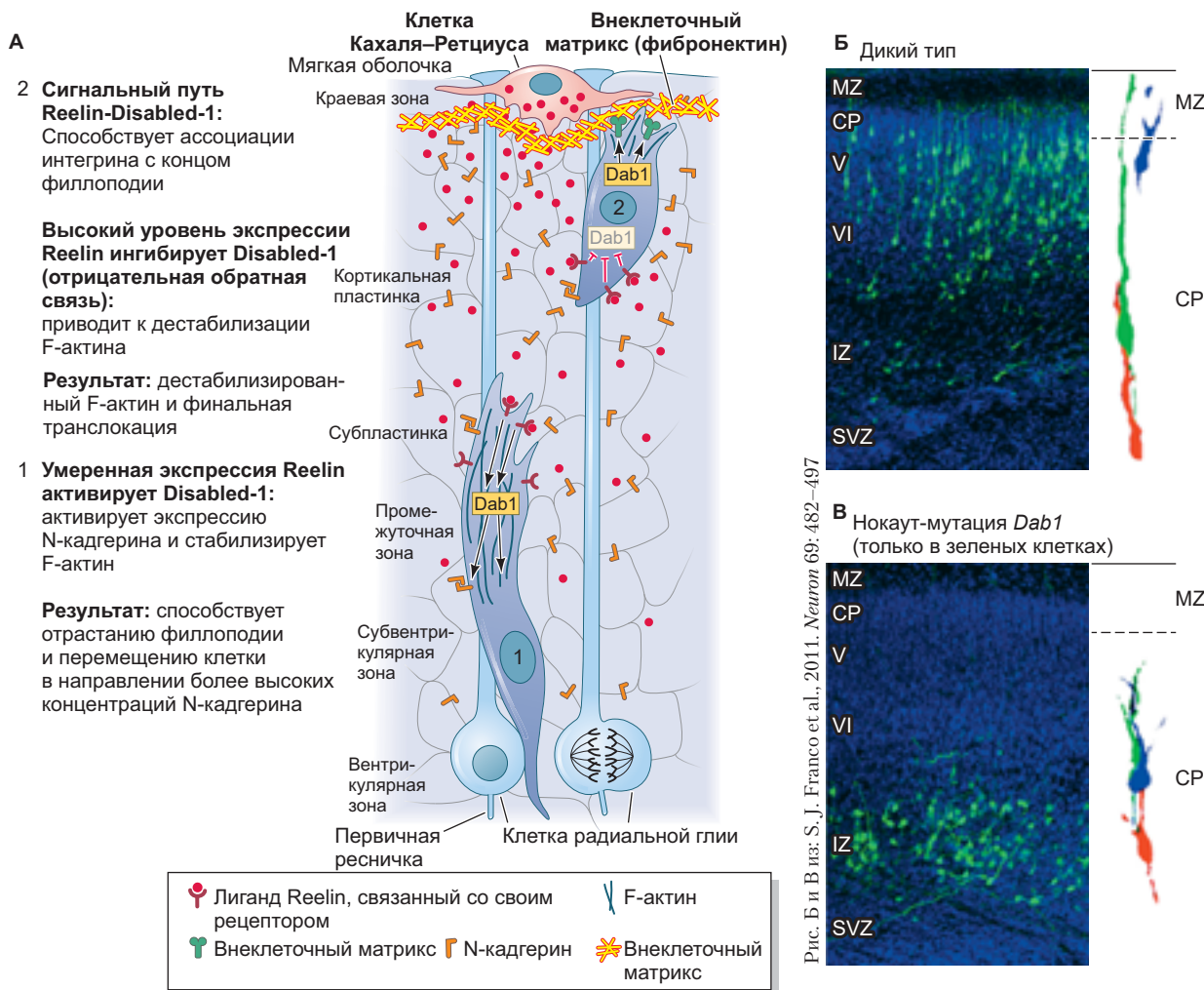


Рис. 14.11. Модель регуляции направленной миграции нейронов с участием Reelin. **А.** Секретируемый клетками Кхаля–Ретциуса Reelin (показан красными точками) градиентно распространяется по внеклеточному матриксу. Reelin воздействует на новообразованные нейроны так, что происходит распространение филлоподий из их базальной мембраны в сторону мягкой оболочки. Disabled-1 (*Dab1*) активируется белком Reelin. Продукт гена *Dab1* стабилизирует актин филаментов (F-актин), а также усиливает экспрессию N-кадгерина. N-кадгерин локализуется на мембранах клеток радиальной глии и других клеток эпителия, причем его концентрация достигает наивысших значений вблизи краевой зоны. Ранняя сигнализация Reelin-*Dab1* обеспечивает распространение филлоподий в направлении краевой зоны и транслокацию нейрона (1). В мигрирующем нейроне, приближающемся к краевой зоне (клетка 2), *Dab1* усиливает экспрессию интегрина в кончике филлоподии, что способствует закориванию клетки в богатом фибронегином внеклеточном матриксе. В то же время при самых высоких концентрациях Reelin запускается механизм отрицательной обратной связи, ингибирующий *Dab1* через белковую деградацию (клетка 2), что останавливает миграцию и запускает дифференцировку клетки в специфичном кортикальном слое. **Б, В.** Кондиционная инактивация *Dab1* в новообразованных нейронах и мигрирующих клетках-предшественниках. Использованы две линии мышей — дикий тип и линия, несущая кондиционную мутацию *Dab1*, которую активирует присутствие гена CRE. CRE не влияет на клетки мышей дикого типа. Плазмида, несущая CRE и GFP, была введена в клетки-предшественники двух линий мышей. Клетки с плазмидой можно отличить по экспрессии GFP (зеленые). **Б.** Контроль дикого типа показывает, что клетки-предшественники с плазмидой успешно достигают слоя кортикальной пластинки. **В.** У линии с кондиционной мутацией *Dab1* блокируется в зеленых, экспрессирующих GFP и CRE клетках. Эти клетки задерживались в промежуточной зоне. Интервальная видеосъемка одиночной клетки показывает, что нормальная клетка-предшественник начинает миграцию с удлинения (показано красным), потом отращивает базальный отросток к маргинальной зоне (показано зеленым) и, наконец, перемещает апикальный компартмент во внешние слои (синий) (рис. Б, справа). Схожая съемка показывает инициацию миграции в *Dab1*-мутантных клетках, которые не отращивают базальные отростки и не осуществляют транслокацию (рис. В, справа)

(вблизи маргинальной зоны) нейроны теряют молекулы клеточной адгезии и интегрируются в слой кортикальной пластинки в прогрессивной последовательности изнутри наружу (рис. 14.11А, клетка 2; Feng et al., 2007). Потеря Reelin, его рецепторов или Disabled-1 приводит к инверсии порядка кортикальных слоев: нейроны, которые обычно оказываются во внутренних слоях (слои 4 и 5), попадают в маргинальную зону (слой 1), а клетки внешних слоев (слои 2 и 3) можно обнаружить вблизи субпластинки (рис. 14.11Б, В; Olson et al., 2006; Franco et al., 2011; Sekine et al., 2011).

БЫТЬ ИЛИ НЕ БЫТЬ... СТЕЛОВОЙ КЛЕТКОЙ, ПРЕДШЕСТВЕННИКОМ ИЛИ НЕЙРОНОМ?

Пройдет клетка радиальной глии симметричное или асимметричное деление, зависит от плоскости деления, которая, в свою очередь, обусловлена ориентацией веретена деления и коррелирует с типами образующихся дочерних клеток. Цитокинез, разделяющий радиальную глияльную клетку точно перпендикулярно (планарно) поверхности просвета нервной трубки (т. е. митотическое веретено параллельно ей), может произвести две клетки радиальной глии (Xie et al., 2013). Хотя иногда такое перпендикулярное деление производит разное потомство — клетку радиальной глии и нейрон, чаще наклонные плоскости деления связаны с появлением дочерних клеток разных типов. Когда митотические веретена изменены таким образом, что деления происходят вдоль случайно направленных осей, увеличивается число ранних асимметричных делений и запускается ранний нейрогенез (Xie et al., 2013).

Было показано, что путь дочерней клетки после цитокинеза связан с центриолью, которую она наследует. Две центриоли делящейся клетки различаются своим возрастом: родительская центриоль «старше» дочерней, которая появляется в результате репликации. При каждом делении клетка, получающая «старую» центриоль, остается в вентрикулярной зоне как стеловая, тогда как клетка с «молодой» центриолью покидает место своего рождения и дифференцируется (Wang et al., 2009). Эти две центриоли связаны с разными белками и структурами, что приводит к асимметричному распределению факторов, влияющих на генную экспрессию и клеточный путь. Особое значение имеет первичная ресничка, связанная со старшей центриолью и сохраняющая эту связь при делении. Дочерняя клетка, наследующая центриоль с первичной ресничкой, может немедленно вывести ее в просвет нервной трубки и, следовательно, в спинномозговую жидкость. Спинномозговая жидкость содержит такие факторы как инсулиноподобный фактор роста FGF и Sonic hedgehog, индуцирующие пролиферацию и сигнализирующие клетке оставаться стеловой клеткой радиальной

глии (Lehtinen et al., 2011; Paridaen et al., 2013). Дочерняя клетка, наследующая молодую центриоль, впоследствии образует новую первичную ресничку. Однако эта ресничка скорее вырастет из базального отростка, чем из апикальной поверхности клетки, и будет улавливать другой набор сигналов, влияющих на ее развитие в сторону клетки-предшественника или нейрона (Wilsch-Brauninger et al., 2012).

Деление на зоны высокой и низкой экспрессии Notch напрямую связано с транспортом его ингибитора Numb вместе с Par-3. Рекрутирование этого ингибитора в стволовых клетках с высоким уровнем экспрессии Notch может показаться неожиданным, но Par-3 на самом деле блокирует функцию Numb. Дочерние клетки без Par-3 имеют активный Numb, снижающий уровень Notch и делающий возможным альтернативный, Delta-опосредованный клеточный путь развития (Gaiano et al., 2000; Rasin et al., 2007; Bultje et al., 2009).



Загадки развития

Было показано, что участие N-кадгерина важно для миграции нейральных клеток-предшественников, но как? Клетки вдоль апикально-базальной оси имеют уровень экспрессии кадгерина, что может обеспечивать дорогу в следующий слой, но обычно считается, что кадгерин играет роль в дифференцированной адгезии и сортировке клеток. Может ли клеточная сортировка направлять движение нейральных предшественников в краевую зону аналогично функции E-кадгерина в гастроне *Danio rerio* (см. гл. 4)? В одном из исследований при сравнении тотальных транскриптомов из разных пролиферативных зон неокортекса мыши и человека был показан высокий уровень экспрессии генов клеточной адгезии и внеклеточного матрикса (Fietz et al., 2012), что позволяет предположить роль клеточной адгезии как одного из основных механизмов наслаивания коры мозга.

Развитие человеческого мозга

Есть много различий между людьми и нашими ближайшими родственниками шимпанзе и бонобо (Prufer et al., 2012). Они включают безволосую потовыделяющую кожу и связанную с прямохождением осанку. Однако самые впечатляющие и важные различия обнаружены в развитии мозга. Исключительный размер и асимметрия человеческого неокортекса и наши развитые способности рассуждать, запоминать, планировать будущее, выучивать язык и обретать культурные навыки делают людей уникальными среди животных (Varki et al., 2008). Развитие человеческого неокортекса потрясюще пластично и всегда продолжается. Несколько особенностей раз-

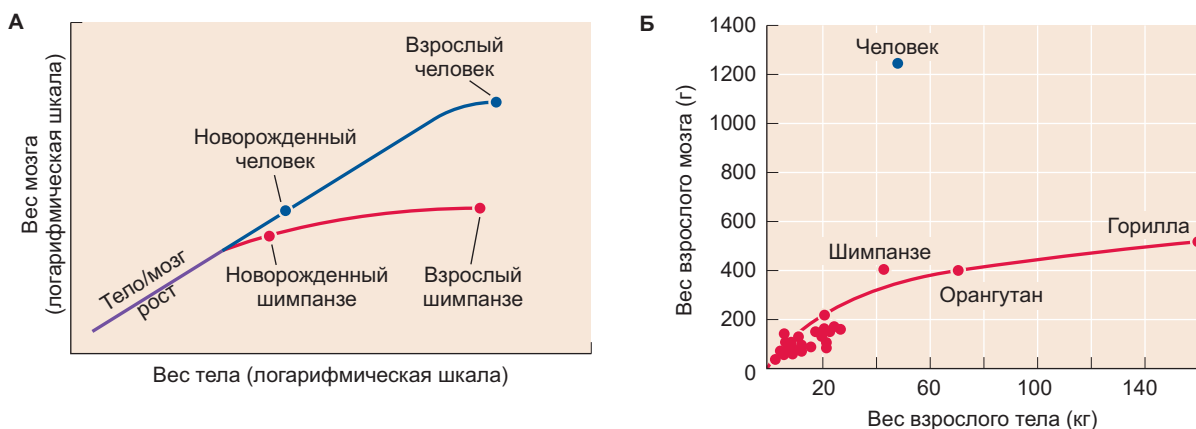


Рис. 14.12. Рост мозга у приматов. **А.** В то время как у остальных приматов (например, шимпанзе) нейрогенез в основном завершается к моменту рождения, у новорожденных людей производство новых нейронов продолжается в том же темпе, что и в фетальном мозге. **Б.** Соотношение веса мозга и тела (индекс энцефализации) у людей в 3,5 раза выше, чем у других человекообразных. (По данным: B. Bogin, 1997. *Yrbk Phys Anthropol* 40: 63–89; *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 10661–10668 и S. Herculano-Houzel et al., 2015. *Brain Behav Evol* 86: 146–163.)

вития, известные и у других приматов, отличают развитие человеческого мозга от такового у других видов. Среди них:

- складчатость коры мозга и размер мозга;
- активность специфичных человеческих генов;
- различия в уровне генной транскрипции;
- специфичные для человека аллели регуляторных генов;
- длительное развитие мозга в период взросления.

Фетальный рост нейронов после рождения

Если есть какая-то одна черта, отличающая людей от остального царства животных, то это сохранение фетального темпа роста нейронов. У людей и у человекообразных обезьян мозг быстро растет перед рождением. Однако после родов темп роста мозга у человекообразных сильно снижается, тогда как у людей остается высоким еще около 2 лет (рис. 14.12А; Martin, 1990; Leigh, 2004). Portman (1941), Montagu (1962) и Gould (1977) независимо пришли к заключению, что в течение первого года жизни человек остается «внематочным плодом».

Согласно оценкам, во время раннего постнатального развития мы прибавляем приблизительно 250 000 нейронов в минуту (Purves and Lichtman, 1985). Соотношение веса мозга к весу тела у новорожденных людей и человекообразных обезьян похоже, но к взрослому возрасту соотношение у человека значительно выше, по сравнению с другими приматами (рис. 14.12Б; Bogin, 1997). Действительно, если следовать таблицам созревания человекообразных, человеческая беременность должна длиться 21 месяц. Наше «недоношенное» рождение есть эволю-

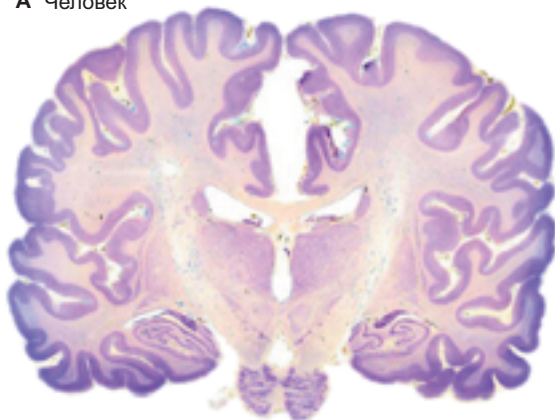
ционный компромисс между размером таза роженицы, окружностью головы плода и зрелостью легких плода. Механизм, поддерживающий фетальный рост нейронов после родов, называют **гиперморфозисом**. Он представляет собой расширение процесса развития за пределы искомого уровня (Virba, 1996; Vinicius and Lahr, 2003).

В дополнение к нейронам, произведенным после родов, вырастает астрономическое число синапсов. На клеточном уровне не меньше 30 000 синапсов на 1 см³ формируются *каждую секунду* в первые несколько лет человеческой жизни. (Rose, 1998; Barriaga, 2003). Предполагается, что новые нейроны и быстро устанавливающиеся нервные контакты способствуют пластичности и обучаемости, обеспечивают исключительный потенциал памяти, позволяют нам развивать такие навыки как язык, юмор и музыка, т. е. все, что делает нас людьми.

Холмы высятся на горизонте обучения

Особенно важной чертой коры мозга, связанной с эволюцией человеческого мозга, является число и сложность «холмов» и «долин» мозга, т. е. его извилин и борозд (Hoffman, 1985). Млекопитающие различаются по числу и развитости складок коры мозга: например, у людей и слонов кора мозга сильно складчатая (**гирэнцефалическая**), у хорьков умеренно складчатая и лишена складок (**лиссэнцефалическая**) у мышей (рис. 14.13). Число и сложность извилин обычно связывают с разумностью, что представляет собой существенную адаптацию, уникально развитую в человеческом мозге. Действительно, известны специфичные мутации у людей, вызывающие лиссэнцефалию, которая приводит к интеллектуаль-

А Человек



Б Мышь

Из: J. H. Lui et al., 2011. *Cell* 146: 18–36

Рис. 14.13. Поперечные срезы человеческого мозга и мозга мыши. Окрашивание Nissl маркирует ядра гирэнцефалического мозга человека (А) и лиссэнцефалического мозга мыши (Б)

ной неполноценности их носителей (Mochida et al., 2009). Каковы механизмы формирования кортикальной складчатости, которые могут определять ее разнообразие у млекопитающих?

Неудивительно, что изучение кортикальной складчатости оказывается сложным, поскольку она встречается у групп млекопитающих, которых трудно изучать в лаборатории. Тем не менее современные работы по архитектуре коры мозга млекопитающих, вместе с анализом их генома, начали проливать свет на эту проблему (Lewitus et al., 2013). Неожиданно оказалось, что увеличенная складчатость не обязательно связана с большим числом нейронов коры мозга, а коррелирует с увеличением поверхности мозга. Так, кортикальную складчатость сравнивали со складыванием бумаги и показали, что когда площадь поверхности расширяется быстрее, чем толщина коры (или листов бумаги), возникает складчатость (Mota and Herculano-Hanzel, 2015). В соответствии с этим наблюдением крупный мозг часто оказывается более складчатым, чем мелкий. Более того, при человеческом расстройстве пахирии в мозге обнаруживаются меньшая складчатость и меньшая площадь поверхности, несмотря на нормальное число нейронов (Ross and Walsh, 2011).

Кандидатами на роль источника механической силы, необходимой для создания складок коры, могут

быть клетки радиальной глии. Вспомним, что клетки радиальной глии не только играют роль стволовых клеток, но и пронизывают кору головного мозга и служат направляющими, способными создавать механическое напряжение. Интересно, что доля клеток радиальной глии, особенно внешней, заметно выше в гирэнцефалическом, чем в лиссэнцефалическом мозге. Более того, в мозге с высокой складчатостью клетки радиальной глии по отношению к извилинам и бороздам распределены так, как нужно для создания необходимых для складчатости напряжений (рис. 14.14; Hansen et al., 2010; Shitamukai et al., 2011; Wanf et al., 2011; Pollen et al., 2015). Увеличение численности клеток внешней радиальной глии в мозге с высокой складчатостью и биомеханика сетей их отростков, взятые вместе, дают серьезное основание считать радиальную глию напрямую вовлеченной в эволюционные механизмы, формирующие складчатость коры мозга.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ, ДЕЛАЮЩИХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ МОЗГ ЧЕЛОВЕКА

Возможность сравнения полных транскриптомов (тотальных мРНК экспрессированных генов в организме) из разных типов мозга привела к открытию дополнительной корреляции между клетками радиальной глии и складчатостью человеческого мозга (Florio et al., 2015; Johnson et al., 2015; Pollen et al., 2015). Например, изучая транскриптомы различных глиальных клеток людей и грызунов, Уолш с соавторами (Johnston et al., 2015) обнаружили, что по сравнению с клетками радиальной глии мышей, клетки внешней радиальной глии людей демонстрируют транскрипционную гетерогенность, связанную с развитием коры, включающую разные транскрипционные факторы, вовлеченные в кальциевую сигнализацию, эпителио-мезенхимные переходы, клеточную миграцию и специфичную активацию пронеуронного транскрипционного регулятора *neurogenin*.

Идентификация гена *ARHGAP11B* привлекла дополнительное внимание к уникальной роли, которую клетки внешней радиальной глии могут играть в развитии человеческой коры мозга. Этот ген обнаружен *только* у людей и *специфично* экспрессирован в клетках радиальной глии (и не в кортикальных нейронах). Когда Huttner с коллегами электропорацией ввели этот ген в клетки развивающейся коры мозга мыши (лиссэнцефалической), то в коре мозга мыши появились складки, напоминающие извилины (рис. 14.15). Механизм, связывающий активность *ARHGAP11B* с появлением извилин, до сих пор не вполне ясен, однако предполагают, что он может быть связан со специфичным и значительным увеличением

числа производимых глиальных клеток (Florio et al., 2015). Это открытие особенно важно для нашего понимания эволюции человеческого мозга. Ген *ARHGAP11B* возник у людей в результате частичной дупликации гена *ARHGAP11A*, имеющегося у большинства животных, и существовал в эволюционной линии человека после ее отделения от ветви шимпанзе (см. рис. 14.15А).

? Загадки развития

Если клетки внешней радиальной глии способны создавать напряжения мягкой оболочки и вызывать формирование складок коры мозга, что может удерживать их апикальные полюса в субвентрикулярной зоне и обеспечивать необходимое сопротивление складыванию ткани. Что привязывает эти клетки, ведь основная разница между ними и клетками вентрикулярной зоны — это отсутствие связи с поверхностью просвета нервной трубки? Какая тянущая сила необходима для формирования складок коры мозга?

Гены роста мозга

Какие еще гены, кроме *ARHGAP11B* отличают нас от наших ближайших родственников — шимпанзе и бонобо? Люди и эти два вида приматов имеют исключительно похожие геномы. При сравнении последовательностей ДНК, кодирующих белки, они оказываются идентичными приблизительно на 99%. Однако белоккодирующие области составляют только около 2% этих геномов. При сравнении полных геномов разница достигает 4% нуклеотидных последовательностей, большая часть которых приходится на некодирующие области геномов (Varki et al., 2008). Кинг и Уилсон (King and Wilson, 1975) на основе изучения белков человека и шимпанзе заключили, что различия организмов шимпанзе и человека в основном являются результатом генетических изменений в нескольких регуляторных системах, в то время как остальные аминокислотные замены, в общем, редко оказываются ключевыми факторами главных адаптивных сдвигов. Они одними из первых предположили, что эволюционные изменения могут

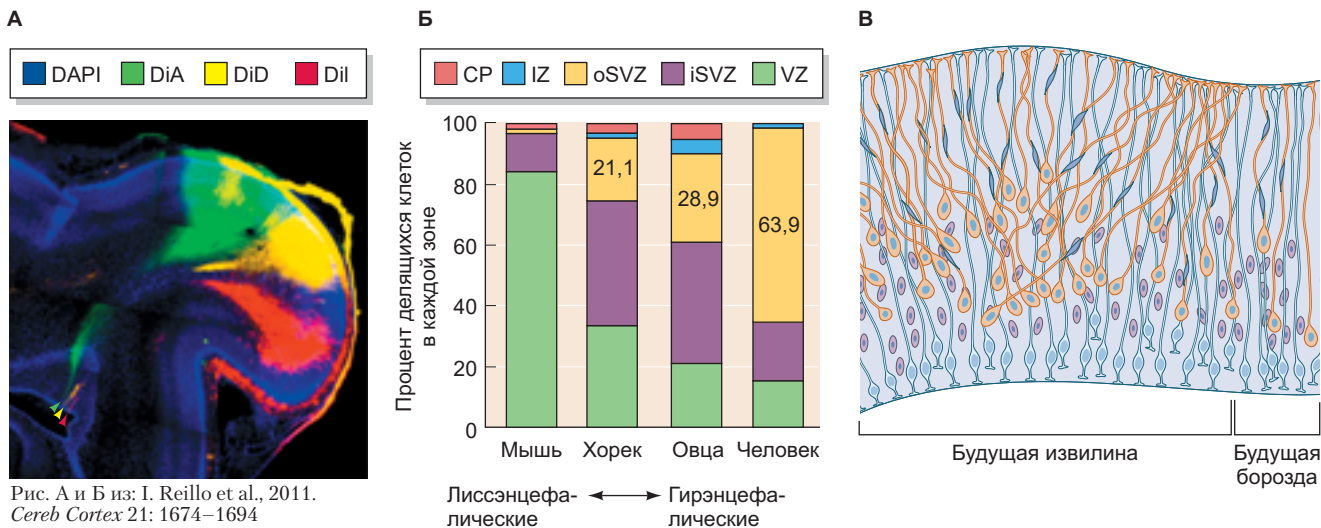


Рис. А и Б из: I. Reillo et al., 2011. *Cereb Cortex* 21: 1674–1694

Рис. 14.14. Распространение радиальной глии во время формирования складок коры мозга в неокортексе хорька. **А.** Ретроградное отслеживание клеток радиальной глии в неокортексе хорька в период нейрогенеза и формирования складок. Обратите внимание на треугольник окрашенных клеток, соответствующий веерному распространению радиальных волокон вдоль апикально-базальной оси. (Стрелки слева внизу показывают тесные кластеры на поверхности просвета нервной трубки, по сравнению с исключительно обширными окрашенными зонами вблизи мягкой оболочки.) DAPI — краситель, окрашивающий ядра; DiA, DiD и Dil — флуоресцентные краски, использованные для маркирования разных популяций клеток радиальной глии разными цветами. **Б.** Количественная оценка митотических клеток в мозге лиссэнцефалических и гирэнцефалических видов. В гирэнцефалическом мозге можно обнаружить больше делящихся клеток во внешней субвентрикулярной зоне (oSVZ), которая также содержит больше клеток радиальной глии, чем у лиссэнцефалических видов. CP — кортикальная пластинка; IZ — промежуточная зона; iSVZ — внутренняя субвентрикулярная зона; VZ — вентрикулярная зона. **В.** Ориентация волокон вентрикулярной (голубая) и внешней радиальной глии (оранжевая) в местах формирования извилин и борозд. Внешняя радиальная глия формирует более диагонально направленные волокна, что предположительно поддерживает формирование борозд. (Рис. В по данным: E. Lewitus et al., 2013. *Front Hum Neurosci* 7: 424/CC BY.)

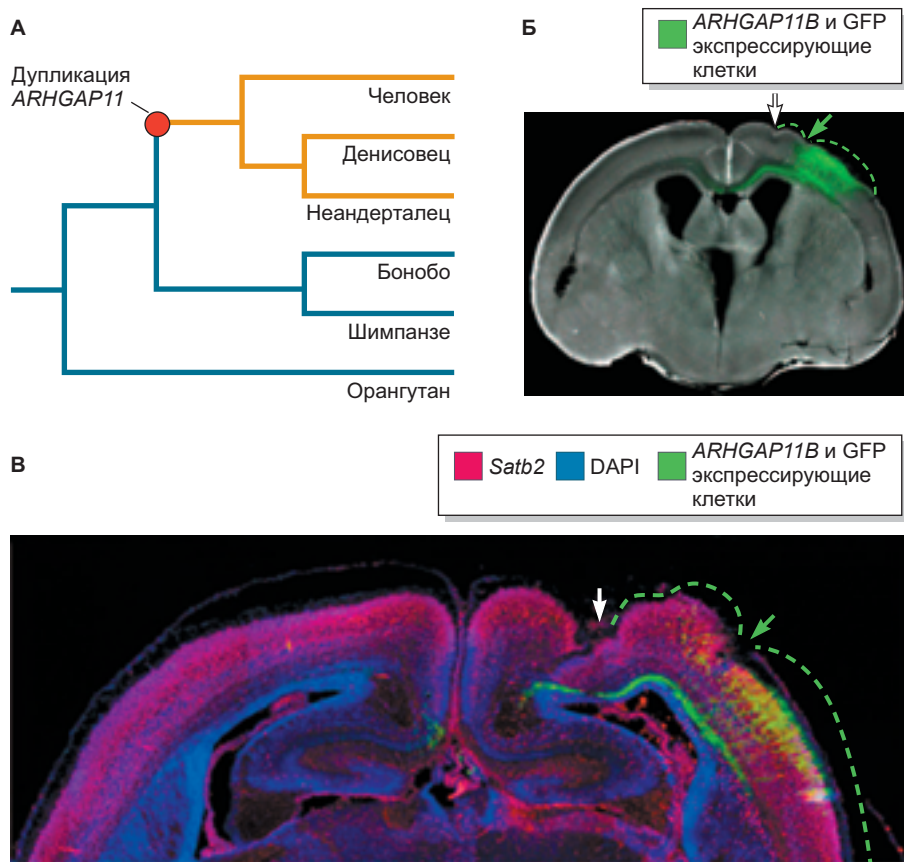


Рис. 14.15. *ARHGAP11B* — это эволюционно молодой человеческий ген, индуцирующий формирование извилин в неокортексе мыши. **А.** На филогенетическом древе приматов показана точка в линии людей, в которой ген *ARHGAP11B* появляется путем частичной дупликации гена *ARHGAP11A*. **Б.** На поперечном срезе мозга мыши представлена экспрессия GFP (зеленый) в клетках, получивших путем электропорации *in utero* конструкцию с GFP и *ARHGAP11B*. **В.** Иммунохимическое исследование с использованием маркера неокортекса (*Satb2*; красный) мозга мыши, электропорированного *ARHGAP11B* (зеленый). Ядра окрашены с помощью DAPI (синий). Пунктирные линии на (Б) и (В) отмечают индуцированные извилины, стрелки показывают борозды

происходить в результате изменений в генах, регулирующих развитие.

Есть гены, участвующие в росте мозга, такие как *ASPM*, называемые также *microcephalin-5* и *microcephalin-1*. Их последовательности различаются у людей и обезьян, но эти различия не коррелируют с исключительным ростом человеческого мозга. Критическая разница скорее связана с регуляторными последовательностями, контролирующими эти гены. Последовательности могут находиться в энхансерных участках ДНК или в участках ДНК, производящих некодирующие РНК. Некодирующие РНК широко представлены в развивающемся мозге, и, хотя они сами не производят белки, они могут регулировать транскрипцию или трансляцию нейрональных транскрипционных факторов. Компьютерный сравнительный анализ геномов млекопитающих позволяет предположить, что некодирующие РНК являются важным фактором эволюции человеческого мозга (Pollard et al., 2006a, b; Prabhakar et al., 2006). Сначала в этих исследованиях были выявлены сравнительно малые группы некодирующих ДНК-областей, последовательности которых сохраняют консервативность среди исследованных млекопитающих, за исключением людей. Такие участки составляют около 2% генома, и предполагается, что если они сохранились без изменений на протяжении эволюции млекопитающих, то это свидетельствует об их важности.

Затем участки сравнили с их гомологами у людей, чтобы понять, есть ли разница по ним между людьми и другими млекопитающими. Было найдено около 50 участков, последовательности которых высоконсервативны у млекопитающих, но изменились у шимпанзе и людей. Быстрее всего изменения произошли в последовательности *HAR1* (*human accelerated region-1*), где между шимпанзе и людьми обнаружили 18 различий. *HAR1* экспрессируется в развивающемся мозге людей и человекообразных, особенно в продуцирующих Reelin клетках Кахаля–Ретциуса, о которых известно, что они направляют миграции нейронов при формировании шестислойного неокортекса (см. рис. 14.11) Исследования функций *HAR1* и других HAR-генов в консервативном некодирующем участке генома продолжаются.

Изменения в количестве транскриптов

В 1970-е гг. А. К. Уилсон (A. C. Wilson) предположил, что различие между людьми и шимпанзе может быть в количестве белков, экспрессирующихся с их генов (Gibbons, 1998). Есть свидетельства, поддерживающие эту гипотезу. С помощью микрочипов для изучения глобального паттерна генной экспрессии в нескольких недавних работах обнаружено, что, хотя количество и типы генов, экспрессиру-

ющихся у шимпанзе и человека в печени и крови исключительно схожи, человеческий мозг производит более чем в пять раз больше мРНК, чем мозг шимпанзе (Enard et al., 2002a; Preuss et al., 2004). У людей транскрипция некоторых генов, например гена *SPTLC1*, мутации которого приводят к повреждению сенсорных нейронов, увеличена в 18 раз по сравнению с экспрессией гомологов в коре мозга у шимпанзе. Эти данные не означают, что все человеческие гены мозга транскрибируются чаще. Есть много генов, активность которых у людей ниже, чем у других приматов. Например, ген *DDX17*, продукт которого участвует в процессинге РНК, в коре у человека экспрессируется в 10 раз *меньше*, чем в коре у шимпанзе.

Подростковый мозг: подключен и раскован

До недавнего времени большинство исследователей считали, что у людей по окончании быстрого роста мозга на стадии фетального развития и в раннем детстве быстрый рост мозга прекращается. Однако данные магнитно-резонансных исследований показали, что мозг продолжает развиваться приблизительно до пубертатного периода и что не все отделы мозга достигают зрелости одновременно (Giedd et al., 1999; Sowell et al., 1999). Вскоре после пубертата рост мозга прекращается и происходит некоторое сокращение числа синапсов. Период этого сокращения совпадает с появлением затруднений при изучении новых языков, что может объяснять, почему дети легче их изучают, чем взрослые. В это же время в определенных областях мозга можно наблюдать волну продукции миелина, белого вещества (гли-

альных клеток, окружающих аксоны). Миелинизация критична для нормальной работы нейронов, и, хотя она продолжается во взрослом возрасте (Lebel and Beaulieu, 2011), самая большая разница между участками мозга в раннем пубертатном и постпубертатном периодах обнаруживается в областях мозга, включающих переднюю кору (рис. 14.16; Sowell et al., 1999; Gogtay et al., 2004). Мозг подростка продолжает активно развиваться, что может объяснять, почему подростки по-разному реагируют на определенные раздражители, а также их способность или неспособность обучаться выполнять определенные задачи.



Загадки развития

Возникновение определенных нейropsychических симптомов часто обнаруживается в подростковые годы, это может быть предвестником развития шизофрении, биполярного расстройства и депрессии. Какие важные события в развитии нервной системы происходят в это время, дерегуляция которых может вызвать эти нейropsychические симптомы?

В исследованиях с использованием функциональной магнитно-резонансной томографии, сканирующей мозг одновременно с быстрым показом тестируемым на экране компьютера эмоционально-заряженных картинок, в мозге подростков обнаруживали активность амигдалы, ответственной за чувство страха и сильные эмоции. Когда те же картинки показывали подросткам более старшего возраста, основная активность была сконцентрирована в лобной доле, ответственной за более взвешенное восприятие (Baird et al., 1999; Luna et al., 2001). Такие данные получены в основном в работах,

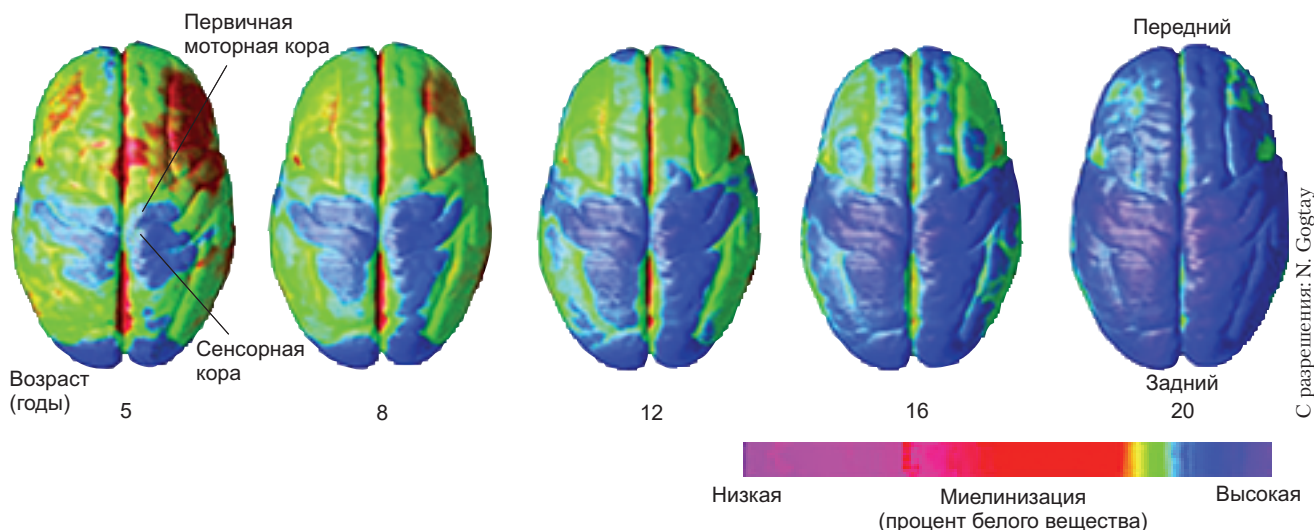


Рис. 14.16. Дорсальная проекция человеческого мозга, демонстрирующая прогрессивную миелинизацию (распространение белого вещества) поверхности коры мозга по мере взросления

сравнивающих разные группы индивидов. Однако развитие технологий позволяет исследовать созревание мозга с ходом времени у отдельного индивида (Dosenbach et al., 2010). Мозг подростка представляет собой сложную и динамичную структуру: понять

подростка нелегко, это знает каждый родитель. Так или иначе, по окончании подросткового возраста сформировавшийся взрослый мозг обычно способен к принятию разумных решений, даже на фоне эмоционального напряжения.



С разрешения: Lisa Nilsson

О фотографии в начале главы

Сложность человечности: как глубоки ее складки? Наш большой изборозженный извилинами мозг есть часть того, что делает нас людьми. На фотографии представлена скульптура Лизы Нильссон, которая хитроумно складывает цветную бумагу, изображая поперечные срезы человеческой анатомии, — в данном случае складки мозга (<http://lisanilssonart.com/home.html>). Кроме того, что она красива, эта фотография отражает художественное представление исследования, в котором моделировали складывание коры мозга в сравнении со сминанием бумаги. Вы также узнали, что увеличение числа типов стволовых клеток в коре мозга и изменения в экспрессии уникальных генов, таких как *HAR1* и *ARHGAP11B*, — среди наиболее важных факторов, обеспечивающих сложность человеческого мозга и отвечающих за его эволюцию. Наконец, уже во взрослом возрасте человеческий мозг продолжает расти и развивается в высокомиелинизированную структуру, примечательную тем, что может воспроизвести себя через искусство.

14

Коротко Рост мозга

1. Дендриты получают сигналы от других нейронов, и аксоны передают сигналы другим нейронам. Пространство между клетками, в котором сигнал переходит от одного нейрона к другому в результате освобождения нейротрансмиттера, называют синапсом. В ЦНС представлено огромное морфологическое разнообразие нейронов.
2. Макроглиальные клеточные типы в ЦНС — это астроглия (астроциты) и олигодендроциты (миелинизирующие клетки). Микроглия тоже играет важную роль «иммунных» клеток нервной системы.
3. Клетки радиальной глии играют роль нейральных стволовых клеток в эмбриональном и фетальном мозге. Нейроны продолжают производиться в определенных отделах мозга у людей всю жизнь, но никогда в таких количествах, как на фетальной стадии.
4. Нейроны мозга организованы в ламины (слои) и ядра (кластеры).
5. Новые нейроны появляются в результате делений нейральных стволовых клеток (нейроэпителиальных и клеток радиальной глии) в стенке нервной трубки, называемой вентрикулярной зоной. Появляющиеся новорожденные нейроны могут мигрировать из вентрикулярной зоны и формируют новый слой, называемый мантией (серое вещество). Нейроны, формирующиеся позже, мигрируют сквозь существующие слои. В результате возникают слои коры мозга.
6. Новорожденные нейроны и клетки-предшественники мигрируют из вентрикулярной зоны по отросткам клеток радиальной глии.
7. В мозжечке мигрирующие нейроны формируют вторую зародышевую зону, известную как гранулярный слой.
8. Самая эволюционно новая часть коры головного мозга млекопитающих, известная как неокортекс, состоит из шести слоев. Каждый слой имеет свою функцию и свой тип расположенных в нем нейронов.
9. Вентрикулярная радиальная глия может давать начало внешней радиальной глии, клетки которой заселяют субвентрикулярную зону. Стволовые клетки могут также порождать промежуточные клетки-предшественники, которые сами способны к дальнейшим симметричным и асимметричным делениям.

10. В мозжечке и конечном мозге секретируемый Reelin направляет миграцию нейронов к нужному приповерхностному слою в последовательности изнутри наружу. Это происходит посредством регуляции экспрессии N-кадгерина и интегрина.
11. Число и сложность извилин и борозд (складчатость) неокортекса коррелируют с уровнем разумности. Люди обладают сильно складчатым (гирэнцефалическим) неокортексом. Клетки радиальной глии, вероятно, играют главную роль в развитии этих складок.
12. Человеческий мозг, по-видимому, отличается от мозга других приматов сохранением высокой скорости роста нейронов в раннем детстве, измененной транскрипционной активностью некоторых генов и присутствием специфичных для людей аллелей регуляторных генов.

Клетки нервного гребня и специфичность аксонов

Суждено ли быть лицу?



© Barresi et al., 2015

В продолжение обсуждения развития эктодермы в этой главе наше внимание будет сфокусировано на двух примечательных явлениях: 1) нервном гребне, клетки которого образуют скелет лица, пигментные клетки и периферическую нервную систему; 2) аксоне нейрона, конус роста которого ведет его к месту назначения. Клетки нервного гребня и конус роста аксона имеют как минимум две ключевых особенности: все они подвижны и внедряются в ткани, являющиеся внешними по отношению к нервной системе.

Нервный гребень

Хотя нервный гребень и берет свое начало из эктодермы, он так важен, что иногда его называют «четвертым зародышевым листком» (Hall, 2009). Есть мнение в определенном смысле преувеличенное, что единственная интересная вещь у позвоночных — нервный гребень (Thorogood, 1989). Несомненно, появление нервного гребня — одно из ключевых событий в эволюции животных, так как привело к возникновению челюстей, лица, черепа и двусторонних сенсорных ганглиев у позвоночных (Northcutt and Gans, 1983).

Нервный гребень — переходная структура. Ни у взрослых, ни у зародышей на поздних стадиях его нет. Точнее, клетки нервного гребня, подвергаясь эпителио-мезенхимному переходу, выходят из дорсальной части нервной трубки, после чего активно мигрируют вдоль передне-задней оси и образуют невероятное число клеточных типов (**рис. 15.1; табл. 15.1**).

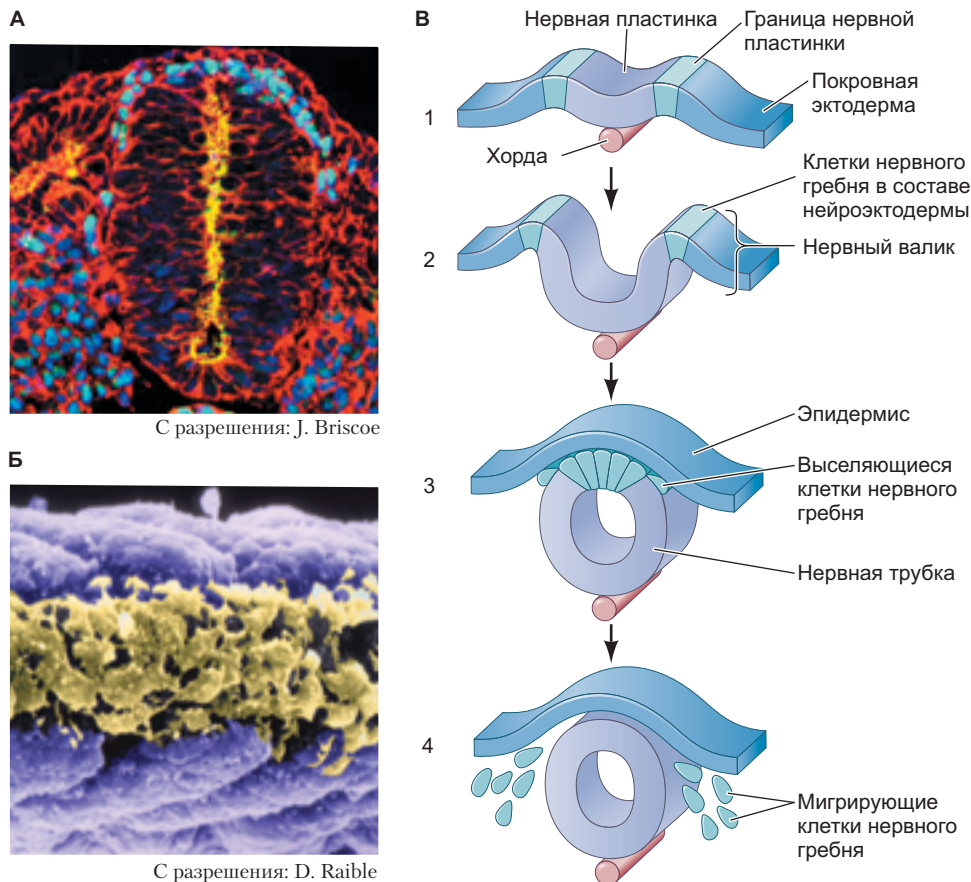


Рис. 15.1. Миграция клеток нервного гребня. **А.** Нервный гребень — переходная структура, расположенная дорсальнее нервной трубки. Его клетки (показаны синим) подвергаются эпителио-мезенхимному переходу, выселяясь из наиболее дорсального отдела нервной трубки (вверху). **Б.** При удалении эпидермиса с дорсальной поверхности зародыша позвоночного клетки нервного гребня (показаны золотистым на фоне фиолетовых сомитов) можно наблюдать в виде скопления мезенхимных клеток над нервной трубкой. **В.** Схема последовательности развития нервного гребня. Развитие начинается от спецификации клеток на границе нервной пластинки (1) и последующего их расположения на вершинах нервных валиков (2) с дальнейшей делами-нацией в месте смыкания нервной трубки (3) и заканчивается выселением их из эктодермальной ткани (4). (Рис. В по данным: M. Simões-Costa and M. E. Bronner, 2015. *Development* 142: 242–27.)

ТАБЛИЦА 15.1. Некоторые производные нервного гребня

Производное	Формируемая структура или клеточный тип
Периферическая нервная система	Нейроны, включая сенсорные ганглии, симпатические и парасимпатические ганглии и сплетения Нейроглиальные клетки Шванновские клетки и другие типы глии
Эндокринные и параэндокринные производные	Мозговое вещество надпочечников Кальцитонин-секретирующие клетки Клетки каротидного тела I типа
Пигментные клетки	Эпидермальные пигментные клетки
Хрящи и кости лица	Хрящи и кости лицевого и переднего вентрального отдела черепа
Соединительная ткань	Эндотелий и строма роговицы Зубной сосочек Дерма, гладкие мышцы и жировая ткань кожи, головы и шеи Соединительная ткань слюнных и слезных желез, тимуса, щитовидной железы и гипофиза Соединительная ткань и гладкие мышцы артерий, проходящие от дуги аорты

По данным: M. Jacobson, 1991. *Developmental Neurobiology*, 2nd ed., Plenum: New York, и др.

Регионализация нервного гребня

Нервный гребень представляет собой популяцию клеток, которая может давать такие различные клетки как (1) нейроны и глиальные клетки сенсорной, симпатической и парасимпатической нервных систем; (2) эпинефринпродуцирующие клетки (мозговое вещество) надпочечника; (3) пигментсодержащие клетки эпидермиса; (4) многие из скелетных и соединительнотканых компонентов головы. Гребень можно разделить на четыре основные (но перекрывающихся) анатомические области, для каждой из которых характерны определенные производные и функции (**рис. 15.2**).

1. Клетки **черепного**, или **головного**, нервного гребня мигрируют, чтобы сформировать черепно-лицевую мезенхиму, которая дифференцируется в хрящи, кости, черепные нервы, глию, пигментные клетки и соединительную ткань лица. Эти клетки производят также жаберные дуги и карманы, дающие клетки тимуса, одонтобласты зачатков зуба, а также кости среднего уха и челюсти.
2. **Сердечный нервный гребень** представляет собой субпопуляцию клеток головного нервного гребня и простирается от ушных плакод до третьей пары сомитов (Kirby, 1987; Kirby and Waldo, 1990). Сердечный нервный гребень развивается в меланоци-

ты, нейроны, хрящи и соединительную ткань (третьей, четвертой и пятой жаберных дуг). Эта область нервного гребня дает также мышечную и соединительнотканную стенки крупных артерий (выносящих протоков), исходящих из сердца; кроме того, она вносит вклад в формирование перегородки, разделяющей легочный круг кровообращения и аорту (Le Lièvre and Le Douarin, 1975; Sizarov et al., 2012).

3. Клетки **туловищного нервного гребня** мигрируют по вентрально-латеральному либо по дорсально-латеральному пути. Вентрально-латерально мигрирующие клетки проходят через переднюю половину склеротома каждого сомита у курицы (см. гл. 17),¹ где дифференцируются в сенсорные нейроны **ганглиев дорсальных корешков**. Клетки, продолжающие путешествовать ближе к вентральной стороне, формируют симпатические ганглии, мозговое вещество надпочечника и кластеры нервов, окружающие аорту. Клетки туловищного нервного гребня мигрируют по дорсально-латеральному пути, двигаясь через дерму кожи от спины к животу, и развиваются в пигментные клетки (например, меланоциты) (Harris and Erickson, 2007).
4. Клетки **вагусного** и **крестцового** нервного гребня образуют **парасимпатические ганглии кишки** (Le Douarin and Teillet, 1973; Pomeranz et al., 1991).

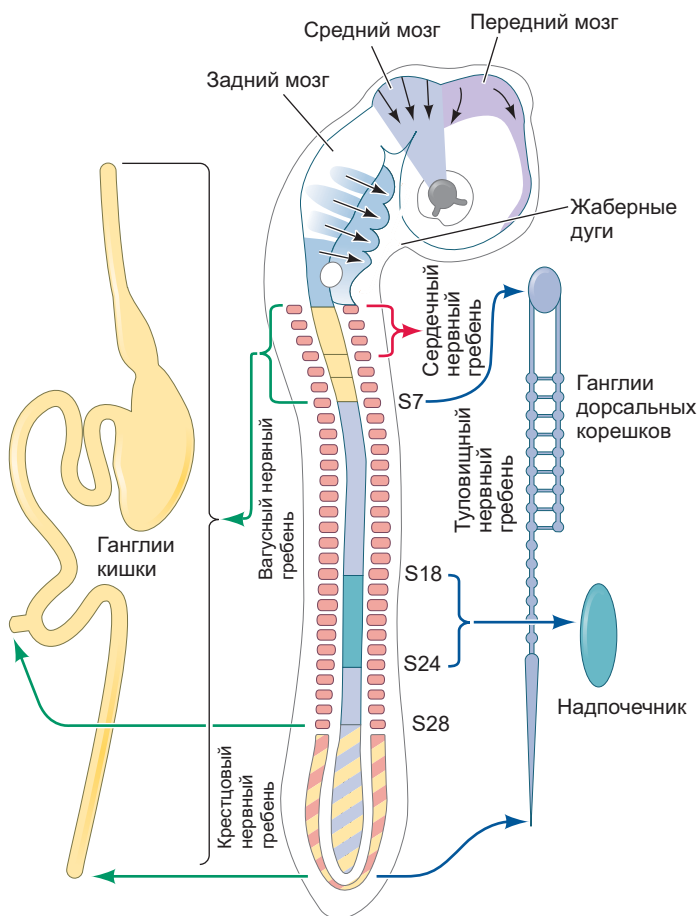


Рис. 15.2. Отделы нервного гребня курицы. Головной нервный гребень мигрирует в жаберные дуги и лицо, чтобы сформировать хрящи и кости лица и шеи. Он вносит также вклад в формирование черепных нервов. Вагусный нервный гребень (расположен на уровне 1–7-й пар сомитов) и крестцовый нервный гребень (в каудальном направлении от 28-й пары сомитов) дают парасимпатические нервы кишки. Клетки сердечного нервного гребня появляются между 1-й и 3-й парами сомитов; они особенно важны для разделения аорты и легочной артерии. Клетки туловищного нервного гребня (от 6-й пары сомитов до хвоста) дают симпатические нейроны и пигментные клетки (меланоциты), а часть из них (на уровне 18–24-й пар сомитов) образует мозговое вещество надпочечников. (По данным: N. M. LeDouarin, 2004. *Mech Dev* 121: 1089–1102, на основе N. M. LeDouarin and M.-A. Teillet, 1973. *Development* 30: 31–48.)

¹ Жаберные дуги (см. рис. 1.12А) представляют собой выпячивания в головной и туловищной областях, в которые мигрируют клетки головного нервного гребня. Глоточные карманы закладываются между этими дугами и становятся вилочковой, щитовидной и околотщитовидной железами.

Вагусный (шейный) нервный гребень перекрывается с границами головного/туловищного гребня, расположенного на уровне 1–7-й пар сомитов, тогда как крестцовый нервный гребень лежит позади 28-й пары сомитов.

Клетки туловищного нервного гребня и головного нервного гребня не равноценны. Клетки головного нервного гребня могут формировать хрящи, мышцы и кости, а также соединительную ткань роговицы, тогда как клетки туловищного гребня не могут. Когда клетки туловищного нервного гребня трансплантировали в головную область, они мигрировали к местам формирования хряща и роговицы, но не сформировали ни того ни другого (Noden, 1978; Nakamura and Ayer-Le Lievre, 1982; Lwigale et al., 2004). Однако клетки и головного, и туловищного нервного гребня могут генерировать нейроны, меланоциты и глиальные клетки (Noden, 1978; Schweizer et al., 1983).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Контроль потенциалов клеток нервного гребня за счет Нох-генов

Туловищный нервный гребень не способен к формированию скелета, скорее всего, из-за экспрессии в его клетках Нох-генов. Если Нох-гены экспрессировать в головном нервном гребне, то его клетки утратят способность формировать ткань скелета; если же клетки туловищного нервного гребня лишат экспрессии Нох-генов — они смогут сформировать скелет. Более того, будучи трансплантированными в туловищную область, клетки головного нервного гребня принимают участие в формировании хрящей туловища, которые в норме не образуются из компонентов нервного гребня. Эта способность формировать скелетную ткань как примитивное свойство нервного гребня могла быть критична для формирования костного панциря, найденного у нескольких видов вымерших рыб (Smith and Hall, 1993). Другими словами, туловищный нервный гребень скорее утратил способность формировать кости, чем головной нервный гребень приобрел ее.

Таким образом, хотя клетки головной и туловищной популяций нервного гребня мультипотентны (клетки головного нервного гребня могут формировать нейроны, хрящи, кости и мышцы, а клетки туловищного нервного гребня — глию, пигментные клетки и нейроны), репертуар клеточных типов, которые они могут образовать при нормальных условиях, все же различен¹. Любопытно, что в условиях эксперимента трансфекция клеток туловищного нервного гребня курицы тремя генами, специфичными для позднего головного нервного гребня (*sox8*, *tfap2b* и *ets1*), достаточна для репрограммирования их в клетки, экспрессирующие *in vivo* известные маркеры головного

нервного гребня. Более примечательно, что трансплантация репрограммированных клеток туловищного нервного гребня в головную область приводит к их дифференцировке в эктопический хрящ в составе челюсти; клетки туловищного нервного гребня, не подвергнутые трансфекции и пересаженные схожим образом, давали начало лишь нейронам и меланоцитам (Simoies-Costa and Bronner, 2016). Эти результаты подтверждают, что клетки головного и туловищного отделов нервного гребня находятся под контролем определенных регуляторных схем, которые могут перепрограммировать по крайней мере клетки туловищного нервного гребня в клетки с потенциалом головного нервного гребня.

Нервный гребень: мультипотентные стволовые клетки?

Споры относительно того, является ли большинство клеток, происходящих из нервного гребня, мультипотентными, или же статус многих из них уже предопределен, продолжались долгое время. Броннер–Фрейзер и Фрейзер (1988, 1989) представили первое доказательство того, что многие из отдельных клеток нервного гребня мультипотентны на момент выхода из его состава. Они инъецировали флуоресцентный декстран в отдельные клетки нервного гребня курицы, пока эти клетки еще оставались в составе нервной трубки, а затем проследили, какими типами клеток становятся их потомки после миграции. Потомки отдельной клетки нервного гребня могут стать сенсорными нейронами, меланоцитами (образующими пигмент клетками), глией (в том числе Шванновскими клетками) и клетками мозгового вещества надпочечника. Предыдущие исследования, напротив, свидетельствовали о том, что исходная популяция туловищного нервного гребня у курицы была гетерогенной смесью клеток-предшественников, половина из которых давала только один клеточный тип (Henion and Weston, 1997; Harris and Erickson, 2007).

С появлением более совершенных методов прослеживания судеб клеток это противоречие может наконец разрешиться. Исследователи из лаборатории Соммера использовали модель мышей-«конфетти»², чтобы проследить путешествие отдельных клеток туловищного нервного гребня и их потомков начиная со стадий до и во время миграции (Baggiolini et al., 2015). Прослеживание идентичности около 100 кле-

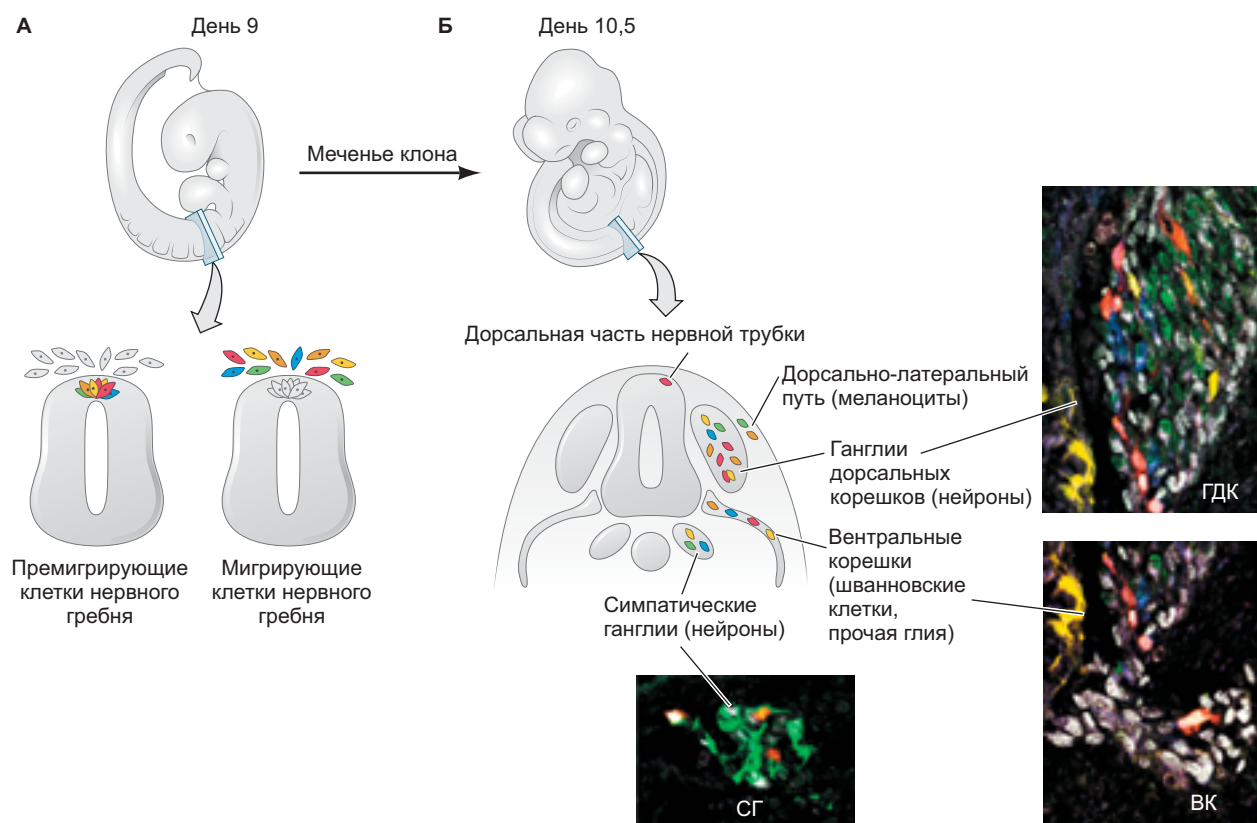
¹ Клетки туловищного отдела нервного гребня мигрируют через среднюю часть каждого сомита *Danio rerio* и через заднюю часть у *Xenopus* иначе, чем это делают клетки нервного гребня курицы в передней области сомита.

² Вспомним из гл. 13, что ганглий представляет собой скопление нейронов, чьи отростки формируют нерв.

точных клонов показало, что примерно 75% клеток пролиферировали, и их потомки продемонстрировали множество типов линий, которые дифференцировались в разные типы клеток: в ганглии дорсальных корешков, симпатические ганглии, Шванновские клетки, покрывающие вентральные корешки, и меланоциты (рис. 15.3). Хотя небольшая популяция клеток нервного гребня с отслеженным путем были унипотентными, подавляющее большинство демонстрировало мультипотентность во время их миграции; эта находка, убедительно показывающая, что клетки туловищного нервного гребня у зародыша мыши представляют собой мультипотентные стволовые клетки, стала важным шагом вперед на пути изучения нервного гребня.

? Загадки развития

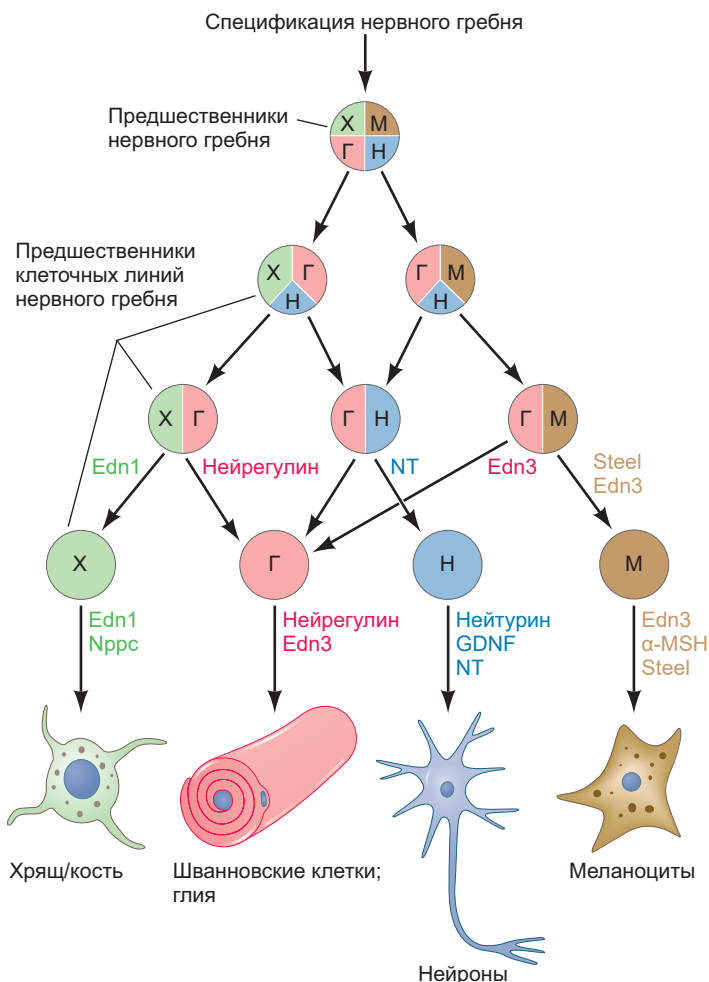
Похоже, мы можем быть уверены, что клетки туловищного нервного гребня являются мультипотентными стволовыми клетками. Возможно ли, чтобы некоторая небольшая популяция, рассеянная среди этих клеток, останется в качестве стволовых клеток взрослого организма, каждая в своем собственном пункте назначения? Онтогенез стволовых клеток взрослого организма неизвестен для многих тканей. Миграционная и мультипотентная природа клеток нервного гребня поддерживает гипотезу о том, что они могут обладать способностями к заселению взрослых тканей.



Из: A. Baggiolini et al., 2015. *Cell Stem Cell* 16: 314–322

Рис. 15.3. Проследивание линии клеток туловищного нервного гребня у мыши показало, что они являются мультипотентными стволовыми клетками. **А.** Клетки нервного гребня на стадиях премиграции и ранней миграции были маркированы с помощью Cre-опосредованной рекомбинации в мышах-«конфетти». Таким способом можно использовать до 10 разных цветов. **Б.** Исследователи проследили пути индивидуально окрашенных клонов вплоть до структур, формируемых ими в позднем развитии. Флуоресцирующие клетки можно было наблюдать на дорсально-латеральном пути, где дифференцируются меланоциты; в ганглиях дорсальных корешков (ГДК), в виде части популяции Шванновских клеток вентральных корешков (ВК) и в симпатических ганглиях (СГ). Микрофотографии демонстрируют движение клеток, меченных на премиграционной стадии с помощью Wnt1-CreERT-конструкции. Они демонстрируют уникальную комбинацию флуоресцентных белков YFP/RFP в трех разных периферических структурах, визуализированных с помощью маркеров, специфичных для клеточных типов

Рис. 15.4. Модель сегрегации клеточных линий нервного гребня и гетерогенности его клеток. Коммитированные предшественники хряща/кости (X), глии (Г), нейронов (Н) и меланоцитов (М), происходящие из промежуточных прогениторных клеток, часть из которых могут вести себя как стволовые клетки. Паракринные факторы, регулирующие этапы этого процесса, обозначены цветом. α -MSH — альфа-меланоцитстимулирующий гормон; Edn — эндотелин; GDNF — глиальный нейротропный фактор; NT — нейротропины; Nprc — предшественник натрийуретического пептида. (По данным: J. R. Martinez-Morales et al., 2007. *Genome Biol* 8: R36/CC BY 2.0.)



Николь Лё Дуаран с коллегами предложили модель развития нервного гребня, которая, похоже, до сих пор остается состоятельной, даже в свете новых данных о мультипотентности. Согласно ей, исходная мультипотентная клетка нервного гребня делится и постепенно ограничивает свои возможности развития (**рис. 15.4**; см. Creuzet et al., 2004; Martinez-Morales et al., 2007; Le Douarin et al., 2008). Чтобы проверить модель непосредственно, отдельную клетку нервного гребня необходимо поместить в различные условия, чтобы определить генерацию различных клеточных типов.

Спецификация клеток нервного гребня

Индукция клеток нервного гребня впервые происходит еще до их выселения из нервной трубки — в ходе ранней гаструляции, на границе между презумптивным эпидермисом и презумптивной нервной пластинкой (Huang and Saint-Jeannet, 2004; Meulemans and Bronner-Fraser, 2004). В передней области на этой же границе сформируются **плакоды** — утол-

щения в поверхностной эктодерме, которые дадут начало хрусталику глаза, внутреннему уху, обонятельному эпителию и другим сенсорным структурам (см. гл. 16). Граница между нервной пластинкой и эпидермисом будет определена благодаря взаимодействию множества **индуктивных сигналов**, в том числе BMP, Wnt и FGF (Basch et al., 2006; Schmidt et al., 2007; Ezin et al., 2009).

В передней области период экспрессии BMP и Wnt критичен для разделения нервной пластинки, эпидермиса, плакод и тканей нервного гребня (**рис. 15.5**). Как мы видели в гл. 11 и 12, если обе BMP- и Wnt-системы активны, то эктодерма развивается в эпидермис, но если антагонист (например, Noggin или FGF) блокирует BMP, эктодерма становится нейральной. Исследования Паттей и коллег (2008, 2009) показали, что Wnt индуцируют BMP, и затем Wnt-каскад **выключается**, клетки становятся коммитированными, чтобы стать передними плакодами, а если Wnt-путь индуцирует BMP, но при этом остается **активной**, клетки приобретают способность становиться нервным гребнем. Результат этих взаимодействий морфогенов отчасти приводит к возникновению промежуточных концентраций BMP, необходимых для спецификации нервного гребня. Кроме

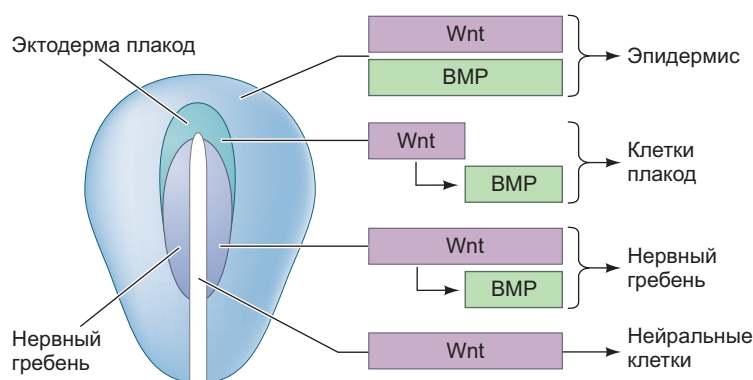


Рис. 15.5. Спецификация клеток нервного гребня. Нервная пластинка ограничена нервным гребнем спереди и сзади и эктодермой плакод спереди. Если эктодермальные клетки получают и BMP, и Wnt-сигналы длительный период времени, они становятся эпидермисом. Если BMP индуцируется за счет Wnt и затем экспрессия Wnt уменьшается, клетки становятся материалом плакод (экспрессирующим гены спецификации плакод, такие как *Six1*, *Six4* и *Eya2*). Если Wnt индуцирует BMP и остается далее активным, то клетки на границе между нервной пластинкой и эпидермисом становятся нервным гребнем (экспрессирующим гены-спецификаторы нервного гребня, такие как *Pax7*, *Snail2* и *Sox9*). Если же они получают только сигнал Wnt (поскольку BMP заблокирован белками Noggin или FGF), то эктодермальные клетки становятся нейральными клетками. (По данным: C. L. Patthey et al., 2009. *PLOS ONE* 3: e1625.)

того, недавно было показано, что внутриклеточный механизм деградации SMAD (зависимых эффекторов сигнального пути BMP) также необходим для ослабления активности BMP-системы до промежуточного уровня, необходимого для индукции нервного гребня (Piacentino and Bronner, 2018).

За последние несколько десятилетий исследования спецификации нервного гребня помогли собрать генную регуляторную сеть (ГРС), обеспечивающую созревание клеток нервного гребня (рис. 15.6). ГРС начинается с того, что BMP и Wnt индуцируют экспрессию набора транскрипционных факторов в эктодерме (в том числе *Gbx2*, *Zic1*, *Msx1* и *Tfap2*), которые в свою очередь регулируют спецификаторов границ нервной пластинки. Спецификаторы, в том числе *Pax3/7* и *dlx5/6*, коллективно придают пограничной области способность формировать нервный гребень, а также клеточные типы дорсальной части нервной трубки. Транскрипционные факторы, специфицирующие границу, затем индуцируют второй набор более специфичных транскрипционных факторов, **спецификаторов нервного гребня**, в клетках, которые станут нервным гребнем. Спецификаторы нервного гребня включают гены, кодирующие транскрипционные факторы *FoxD3*, *Sox9*, *Snail* (на премиграционной стадии) и *Sox10* (на стадии миграции) (Simoes-Costa and Bronner, 2015).

Миграция клеток нервного гребня: из эпителия в мезенхиму и не только

Окружение, через которое мигрируют клетки нервного гребня, неодинаково вдоль передне-задней оси,

благодаря чему клетки нервного гребня из разных регионов проходят различный путь. Подобно автомобилям в потоке уличного движения, они должны двигаться по своим маршрутам, руководствуясь подсказками окружения, и их перемещение находится под влиянием клеток вокруг (рис. 15.7). Наподобие того как автомобили используют свои двигатели и колеса для перемещения по дороге, клетки используют движущую силу их цитоскелета, чтобы удлинить ламеллоподии, хватающиеся за внеклеточный матрикс впереди клетки, и одновременно отпуская тормоза сзади. Автомобиль может свободно двигаться по дороге в одиночку либо путешествовать в потоке, пребывая в зависимости от положения в нем и от дистанции до соседних машин. Так же и клетки нервного гребня могут мигрировать либо по одной, либо кластерами клеток, в зависимости от расстояния до соседней. Как потоком автомобилей управляют инспекторы ГИБДД, барьеры и дорожные знаки, так и местные сигналы локальных факторов адгезии и дальнедействующих секретлируемых факторов, формирующих градиент, управляют миграцией клеток зародыша. И наподобие водителей, не видящих последнего поворота к своему парковочному месту, мигрирующие клетки должны принимать решения пошагово, двигаясь от одного поворота к другому, чтобы достичь своего места назначения. Вспоминайте эту аналогию, по мере того как будете читать о миграции клеток нервного гребня.

Деламинация

Первое видимое событие после спецификации клеток нервного гребня — их эпителио-мезенхимный переход (ЭМП) в ходе подготовки к выселению из нервной трубки. Клетки нервного гребня утрачивают свои ад-

гезивные контакты и отделяются от эпителия в ходе процесса, известного как **деламинация** (рис. 15.8). Время деламинации нервного гребня определяет среда вокруг нервной трубки. Триггером, запускающим ЭМП, оказалась активация генов Wnt под действием BMP. Сами белки BMP (которые может продуцировать дорсальная часть нервной трубки; см. гл. 13) находятся под контролем Noggin, секретируемых хордой и сомитами. При уменьшении экспрессии Noggin, BMP могут функционировать и активировать ЭМП в клетках нервного гребня на премиграционной стадии (Burstyn-Cohen et al., 2004).

Незадолго до деламинации можно различить участки эктодермы в области нервного гребня по экспрессии разных молекул клеточной адгезии: покровная эктодерма экспрессирует E-кадгерин, премиграционные клетки нервного гребня экспрессируют кадгерин-6В, а в нервной трубке экспрессируется N-кадгерин (рис. 15.9). Сигналы Wnt и BMP приводят к экспрессии основных регуляторных факторов ЭМП (например, Snail-2, Zeb-2, Foxd3 и Twist) в деламинирующих клетках нервного гребня. Sox2 экспрессируется клетками нейроэктодермы (пластинки/складок/трубки) и работает отчасти как

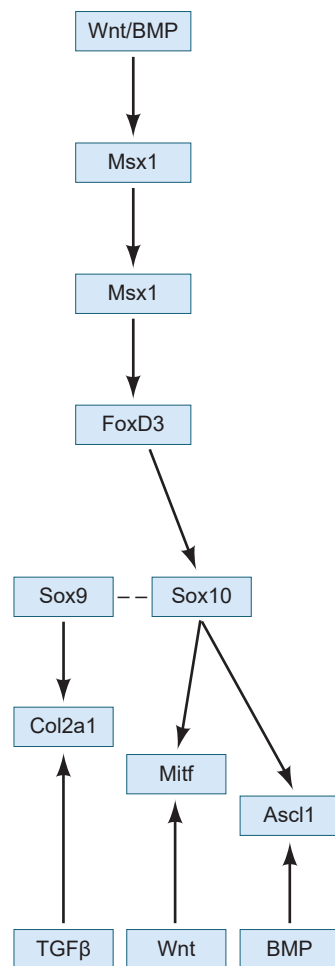
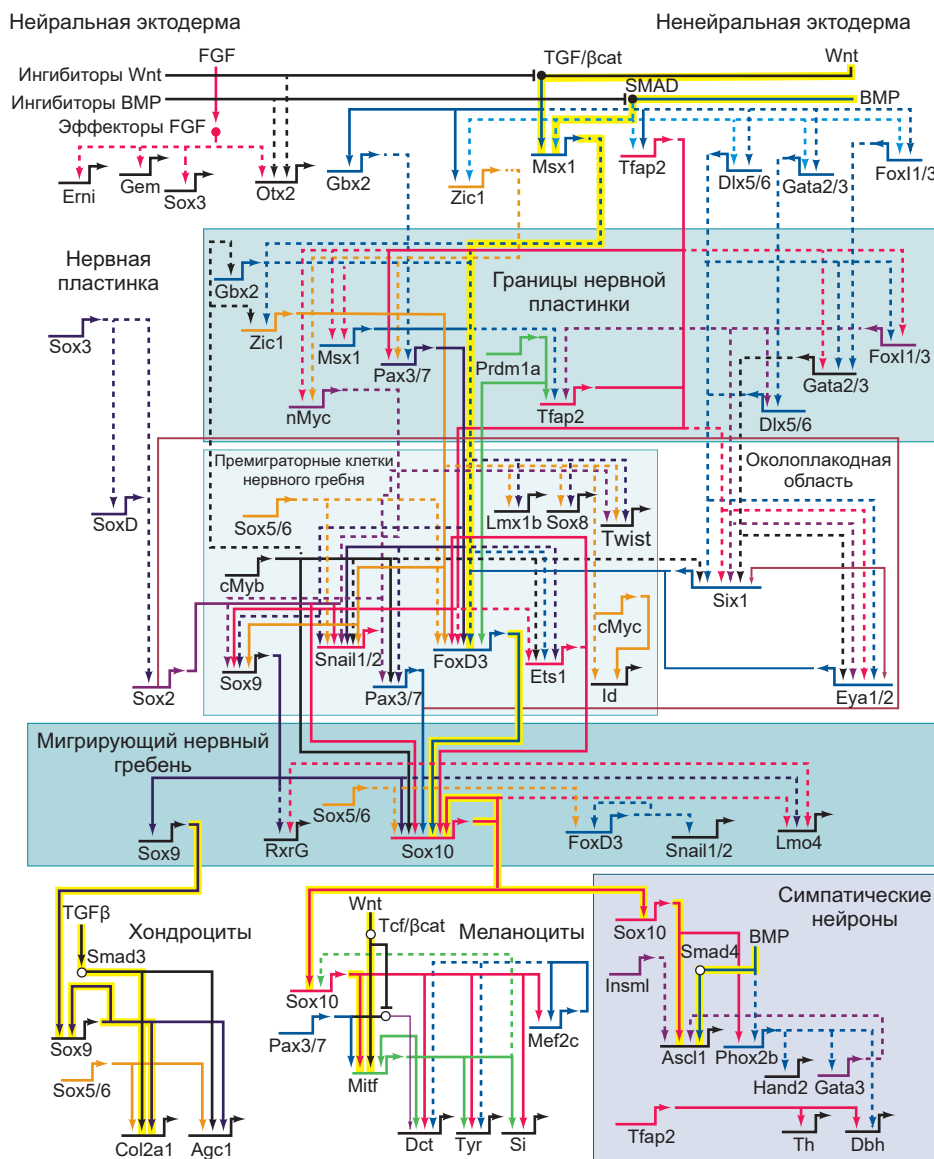


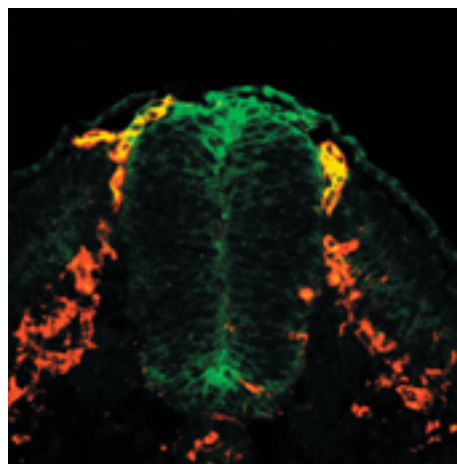
Рис. 15.6. Генная регуляторная сеть развития нервного гребня. Эта ГРС представляет собой компиляцию данных, полученных для разных позвоночных. Одна из наиболее важных схем (выделена желтым) показывает экспрессию генов в клетках с момента ранней эктодермы (наверху) до формирования производных клеточных типов (внизу). Схема представлена в упрощенном линейном виде справа. (Обратите внимание: отражены не все производные клеточные типы.) (По данным: M. Simões-Costa and M. E. Bronner, 2015. *Development* 142: 242–257.)



Рис. 15.7. Аналогия миграции клеток нервного гребня и аксонов с регулировкой уличным движением

репрессор экспрессии *Snail-2*, тогда как *Snail-2*, экспрессируемый дорсальнее в премиграционных клетках области нервного гребня, перекрестно подавляет экспрессию *Sox2* (Duband et al., 2015). Как мы видели на примере паттернирования вентральной части нервной трубки (см. гл. 13), эта перекрестная транскрипционная репрессия помогает уточнить границы между эпителием нервной трубки (N-кадгерин), клетками нервного гребня на стадии премиграции (кадгерин-6В) и покровной эктодермой (Е-кадгерин) (см. рис. 15.9).

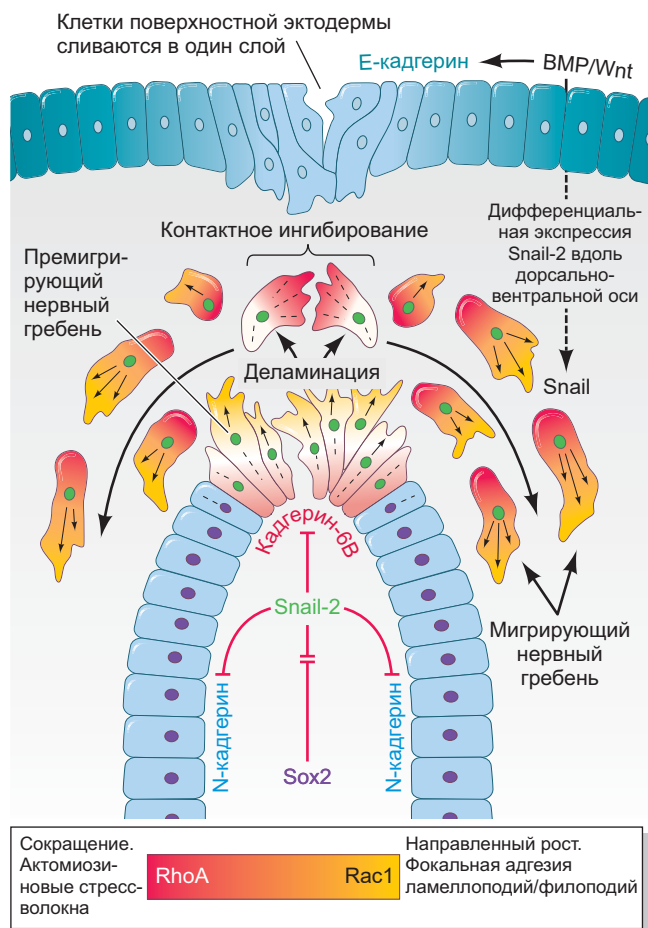
Когда молекулярная регуляторная сеть уже подготовила премиграционные клетки нервного гребня к ЭМП, какие биомеханические факторы помогают запустить это событие? Недавно проведенные исследования головной области зародыша *Xenopus* показали, что подлежащая мезодермальная среда существенно меняется, превращаясь в более жесткий субстрат, и эти биомеханические изменения оказались необходимыми для инициации ЭМП



Из: J.-P. Liu and T. M. Jessell, 1998, *Development* 125: 5055–5067, с разрешения Т. М. Jessell

Рис. 15.8. Мигрирующие клетки нервного гребня, обработанные антителами к HNK-1, распознающими углевод на поверхности клеток, вовлеченный в миграцию клеток нервного гребня. Белок RhoV (зеленый) экспрессируется в клетках по мере их деламициации. Клетки, экспрессирующие и HNK-1, и RhoV, показаны желтым

Рис. 15.9. Деламинация нервного гребня и миграция путем контактного ингибирования. Процесс деламинации нервного гребня показан в момент, когда нервная и поверхностная эктодермы разделяются и обе ткани находятся в процессе слияния: нервная эктодерма — в нервную трубку, а поверхностная эктодерма — в эпидермис. Сигналы BMP и Wnt определяют три основные области нейроэпителия, различающиеся по экспрессии уникальных адгезионных белков: поверхностную эктодерму (Е-кадгерин), нервную трубку (N-кадгерин) и премигрирующий нервный гребень (кадгерин-6В). В премигрирующем домене уровень BMP наиболее высокий, а концентрация Wnt промежуточная; такое соотношение поддерживает экспрессию *Snail-2* (и *Zeb-2*) на высоком уровне в этих клетках. Белок *Snail-2* подавляет N-кадгерин и Е-кадгерин в этом домене. Экспрессия кадгерина-6В повышена только в премигрирующих клетках апикальной части нервного гребня, и ее функция заключается в активации RhoA и актомиозиновых сократительных волокон с целью апикального сокращения и инициации деламинации. Неканонический Wnt-каскад (не показан) определяет полярную активность RhoA (красный) и Rac1 (желтый) вдоль оси миграции клеток нервного гребня. Когда клетки нервного гребня контактируют друг с другом, они испытывают контактное ингибирование, в результате чего останавливаются, поворачиваются и мигрируют прочь в противоположном направлении



головного нервного гребня. Гулять по рыхлому песку сложнее, чем по мощеной дорожке, так и рано специфицированные немигрирующие клетки нервного гребня менее расположены к деламинации и миграции через рыхло упакованную популяцию подлежащих мезодермальных клеток (**рис. 15.10**). Однако в ходе гаструляции конвергентное вытяжение продолжает упаковывать мезодермальные клетки по средней линии во все более уплотняющийся слой. Оказалось, что уплотнение мезодермы необходимо и достаточно для запуска ЭМП клеток головного нервного гребня и поддержания их миграции у *Xenopus* (Barriga et al., 2018).

Движущая сила контактного ингибирования

Выталкиванию клеток нервного гребня из дорсальной части нервной трубки, как оказалось, способствуют такие же клетки нервного гребня (Abercrombie, 1970; Carmona-Fontaine et al., 2008). Этот феномен **контактного ингибирования локомоции** возникает, когда две мигрирующие клетки устанавливают контакт. В результате из-за деполимеризации цитоскелета в каждой из них прекращается

активность по формированию ламеллоподий вдоль сокращающихся поверхностей и новые выпячивания формируются в стороне от точки контакта (**рис. 15.11**; Carmona-Fontaine et al., 2008; Scarpa et al., 2015). Такое поведение может привести к рассеиванию клеток. Фактически, тесно контактируя друг с другом, клетки нервного гребня контактно ингибируют формирование ламеллоподий на всех поверхностях клетки, за исключением той, которая обращена к лидирующему краю потока (Roycroft and Mayor, 2016).



Загадки развития

Некоторые типы эмбриональных клеток-предшественников, например пограничные клетки яичника *Drosophila* и зачатки боковой линии у *Danio*, обладают способностью к коллективной миграции. Сохраняется ли у какой-либо клеточной линии взрослого организма подобное поведение, в результате которого клетки «внедряются» в другие ткани? Если бы это было так, проходили бы эти клетки эпителио-мезенхимный переход так же, как клетки нервного гребня?

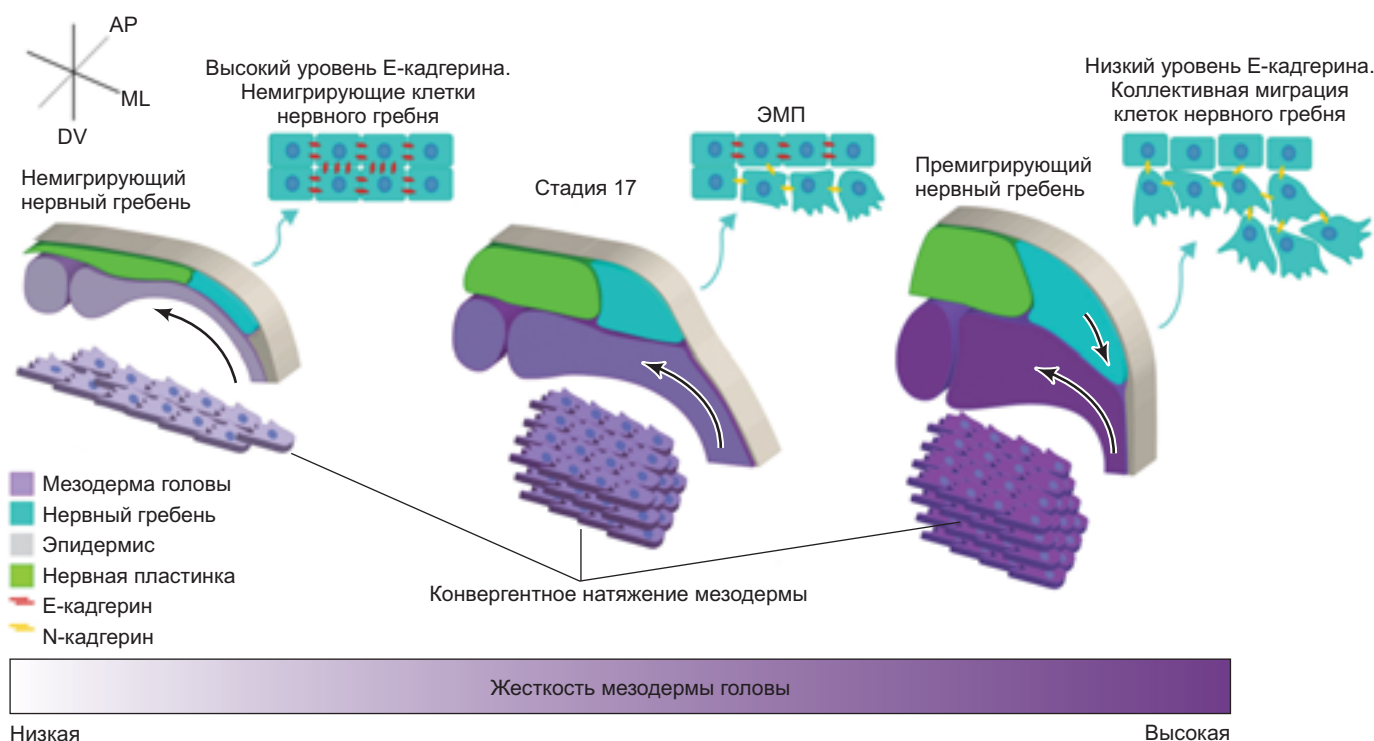
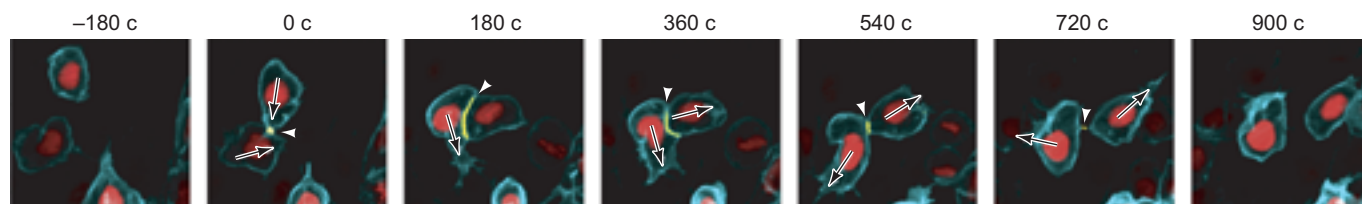


Рис. 15.10. Компактизация мезодермы путем конвергентного натяжения обеспечивает жесткость ткани, составляющей нервную пластинку. Жесткость необходима для эпителио-мезенхимного перехода (ЭМП), который претерпевают клетки головного нервного гребня у *Xenopus*. Со сменой экспрессии Е-кадгерина на N-кадгерин при переходе от немигрирующих клеток нервного гребня к премигрирующим подлежащая мезодерма активно компактизуется в направлении к средней линии, которая увеличивает жесткость мезодермального слоя со временем. Жесткость дает большее напряжение, способствующее ЭМП в нервной пластинке, а также более стабильный субстрат для миграции клеток нервного гребня. (По данным: Е. Н. Barriga et al., 2018. *Nature* 554: 523–527.)

Коллективная миграция

Путешествие в составе группы автомобилей, направляющихся в одно и то же место, отличается от путешествия по дороге в одиночку. Быть частью группы — значит кооперироваться и держаться друг друга в ходе поездки. Схожий паттерн миграции клеток в зародыше называют **коллективной миграцией** (рис. 15.12).

И эпителиальные, и мезенхимные клетки могут мигрировать коллективно, когда клетки на лидирующем краю задают направление и движут всем кластером (Scarpa and Mayor, 2016). Клетки головного нервного гребня обычно совершают миграцию коллективно и даже могут делать это в культуре (Alfandari et al., 2003; Theveneau et al., 2010). Такая способность говорит о том, что для коллективной миграции внешние факторы, например хемоаттрак-



Из: E. Scarpa et al., 2015. *Dev Cell* 34: 421–434/CC BY 4.0

Рис. 15.11. Мигрирующие клетки нервного гребня демонстрируют контактное ингибирование локомоции в живом зародыше *Danio rerio*. Серийные фотографии нервных клеток, сделанные через промежутки времени, показывают экспрессию *mCherry* в ядре (красный) и зеленого флуоресцентного белка в плазматической мембране (голубой). При контакте мембран (желтый, показано наконечником стрелки) обе клетки образуют отростки в стороны от места контакта. Стрелками отмечено направление миграции клеток

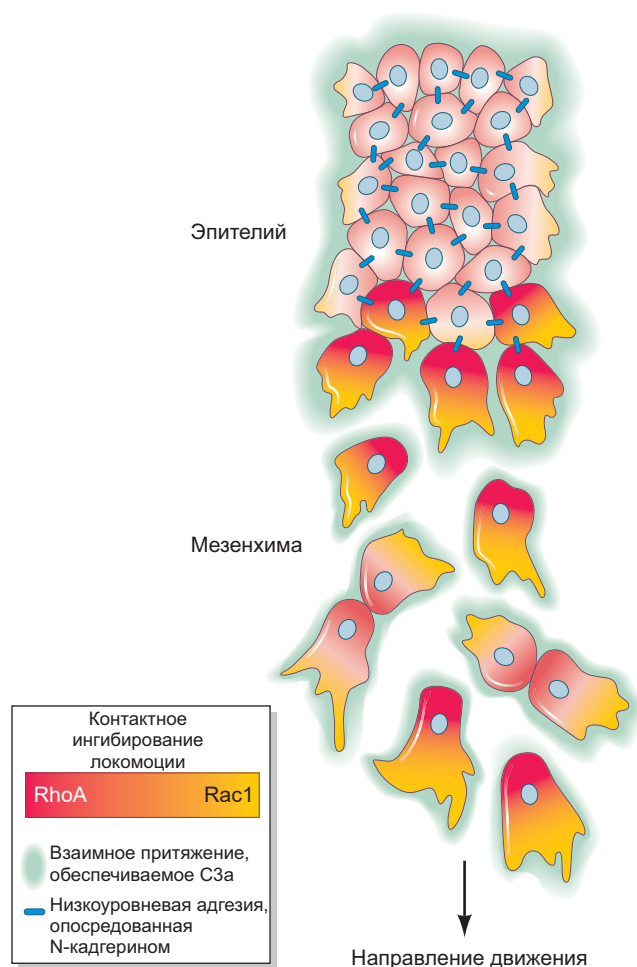
Рис. 15.12. Модель коллективной миграции клеток нервного гребня. Известно, что некоторые популяции клеток нервного гребня мигрируют коллективно в виде большой группы. Коллективная миграция требует определенного уровня межклеточной адгезии, опосредованной низким уровнем экспрессии N-кадгерина (*синие* рецепторы). Коллективно мигрирующие клетки нервного гребня секретируют также сигнал-аттрактант С3а (компонент системы комплемента 3а), что обеспечивает постоянное совместное притяжение, предотвращающее их рассеяние. Паттерн миграции группы имеет *коллективное направление* из-за постоянного контактного ингибирования среди клеток лидирующего края. Контактное ингибирование подавляется дифференциальной активацией Rho-ГТФаз (*от красного к желтому*). (По данным: E. Scarpa and R. Mayor, 2016. *J Cell Biol* 212: 143–155.)

танты, не являются необходимыми, а свойств этих клеток достаточно для поддержания организации кластера и направленной миграции. Симуляционное моделирование подтверждает, что для эффективной коллективной миграции необходимы и контактное ингибирование локомоции, и совместная аттракция между клетками; это демонстрируют наблюдения *in vivo* и *in vitro* (Carmona-Fontaine et al., 2008; Woods et al., 2014). Действительно, клетки головного нервного гребня у *Xenopus* не только подвержены Wnt/PCP-зависимому RhoA-механизму контактного ингибирования локомоции, но и секретируют компонент комплемента 3а (С3а), который привлекает клетки нервного гребня, экспрессирующие рецептор С3а. Эти же клетки нервного гребня экспрессируют низкий уровень N-кадгерина (см. рис. 15.12). Экспериментальное увеличение уровня N-кадгерина приводит к более сильной адгезии в популяции клеток нервного гребня, что делает невозможным вторжение в межклеточное пространство с той же скоростью; это наблюдение говорит о том, что оптимальный уровень N-кадгерина может быть необходим для нормальной коллективной миграции этих клеток и их внедрения в ткань (Theveneau et al., 2010; Kuriyama et al., 2014).

Пути миграции клеток туловищного нервного гребня

Следом за ранней спецификацией и деламинацией клетки нервного гребня мигрируют разными путями к своим пунктам назначения для окончательной дифференцировки. Откуда они «знают», куда идти?

Клетки нервного гребня, выселяющиеся из нервной трубки на уровне передне-задней оси тела, следуют одним из двух основных путей (**рис. 15.13**). Многие из выселяющихся на раннем этапе следуют **вентральному** или **вентрально-латеральному** пути миграции. Эксперименты по картированию путей



развития показали, что эти клетки становятся сенсорными (нейронами дорсальных корешков) и автономными нейронами, клетками мозгового вещества надпочечников, а также Шванновскими и прочими глиальными клетками (Weston, 1963; Le Douarin and Teillet, 1974). У птиц и млекопитающих (но не у рыб и земноводных) эти клетки мигрируют вентрально через передний — но не через задний — отдел склеротома (Rickmann et al., 1985; Bronner-Fraser, 1986; Loring and Erickson, 1987; Teillet et al., 1987)¹.

Клетки туловищного нервного гребня, мигрирующие по второму (дорсально-латеральному) пути, становятся меланоцитами, меланинсодержащими пигментными клетками. Они путешествуют между эпидермисом и дермой, проникая в эктодерму через небольшие бреши в базальной пластинке (которые сами могут создавать). Оказавшись в эктодерме, они заселяют кожу и волосяные фолликулы (Mayer, 1973; Erickson et al., 1992). Дорсально-латеральный путь был продемонстрирован в серии классических экспериментов Мэри Ролс (1948), трансплантировавшей

¹ Мы ввели понятия «радужного» (*rainbow*) картирования клеточного пути развития в гл. 2 и описали использование мышей-«конфетти» в качестве модели для прослеживания идентичности клеточных линий в гл. 5.

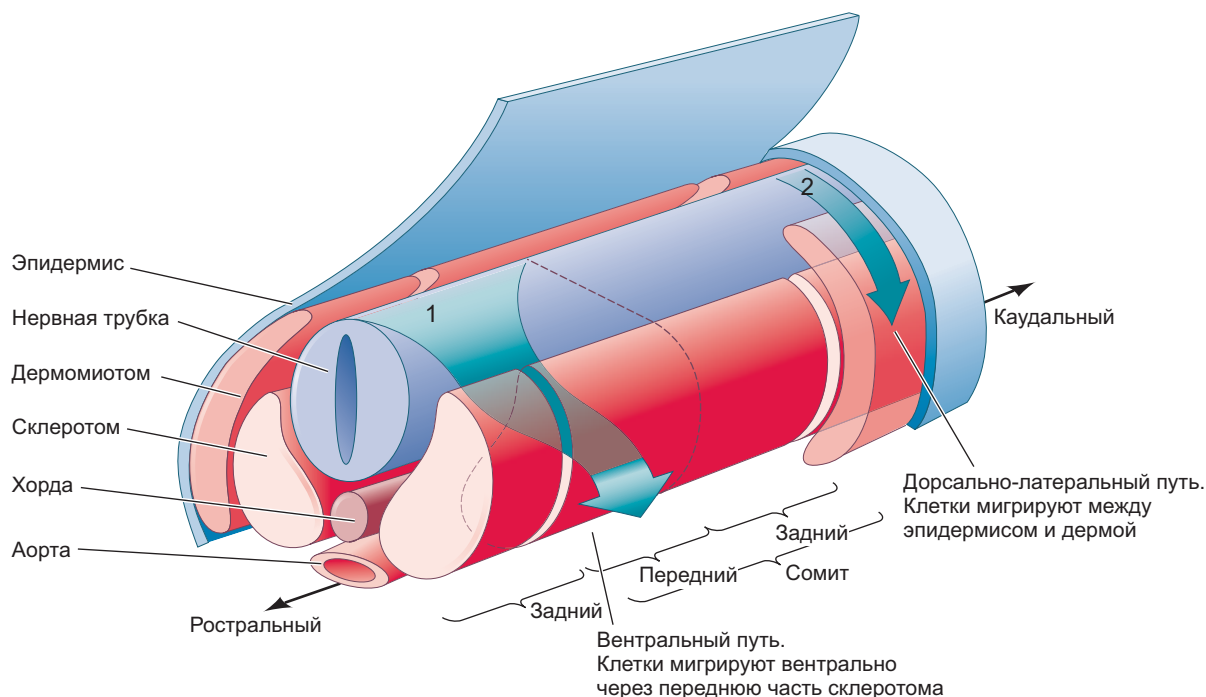


Рис. 15.13. Схема миграции клеток нервного гребня в туловищном отделе зародыша курицы. Клетки, мигрирующие по вентральному пути (1), проходят через переднюю область склеротома (часть сомита, дающая хрящи позвоночника). Изначально они находятся на уровне заднего отдела склеротома, затем мигрируют вдоль нервной трубки до тех пор, пока не достигнут переднего его отдела. Эти клетки вносят вклад в симпатические и парасимпатические ганглии, а также дают клетки мозгового вещества надпочечников и ганглии дорсальных корешков. Несколько позже другая популяция клеток туловищного отдела нервного гребня направляется по дорсально-латеральному пути (2), при этом миграция происходит на уровне всех областей сомита. Эти клетки мигрируют под эктодермой и становятся пигментпродуцирующими меланоцитами. (Пути миграции показаны только на одной стороне зародыша.) (По данным: N. M. LeDouarin et al., 1984. В: *The role of Extracellular Matrix in Development* (42nd Symp Soc Dev Biol), R. L. Trelstad (ed.), pp. 373–398. Alan R. Liss: New York.)

участок нервной трубки вместе с лежащим выше нервным гребнем от цыпленка пигментированной породы в участок нервной трубки цыпленка-альбиноса и обнаружившей пигментированные перья в белом крыле донора (см. рис. 1.14). Данные исследования вместе с примечательными химерами «курица-перепел» (Teillet et al., 1987) показали, что клетки нервного гребня, изначально расположенные напротив задней области сомита, мигрируют вперед или назад вдоль нервной трубки так, что могут специфично внедриться в переднюю область сомита. Эти клетки объединяются с соседними потоками клеток нервного гребня, внедряющимися в ту же переднюю область сомита, и вносят вклад в формирование тех же структур. Таким образом, каждый ганглий дорсального корешка состоит из популяций клеток нервного гребня, происходящих из трех соседних сомитов: одна популяция — из нервного гребня, расположенного на уровне передней части сомита, и по одной популяции клеток — из областей нервного гребня, расположенных на уровне задней части сомита (соответствующего ганглию) и соседствующих с ним сомитов (см. рис. 15.13).

Вентральный путь

Выбор между дорсально-латеральным и вентральным путями в туловищном отделе делается в дорсальной части нервной трубки, вскоре после спецификации клеток нервного гребня (Harris and

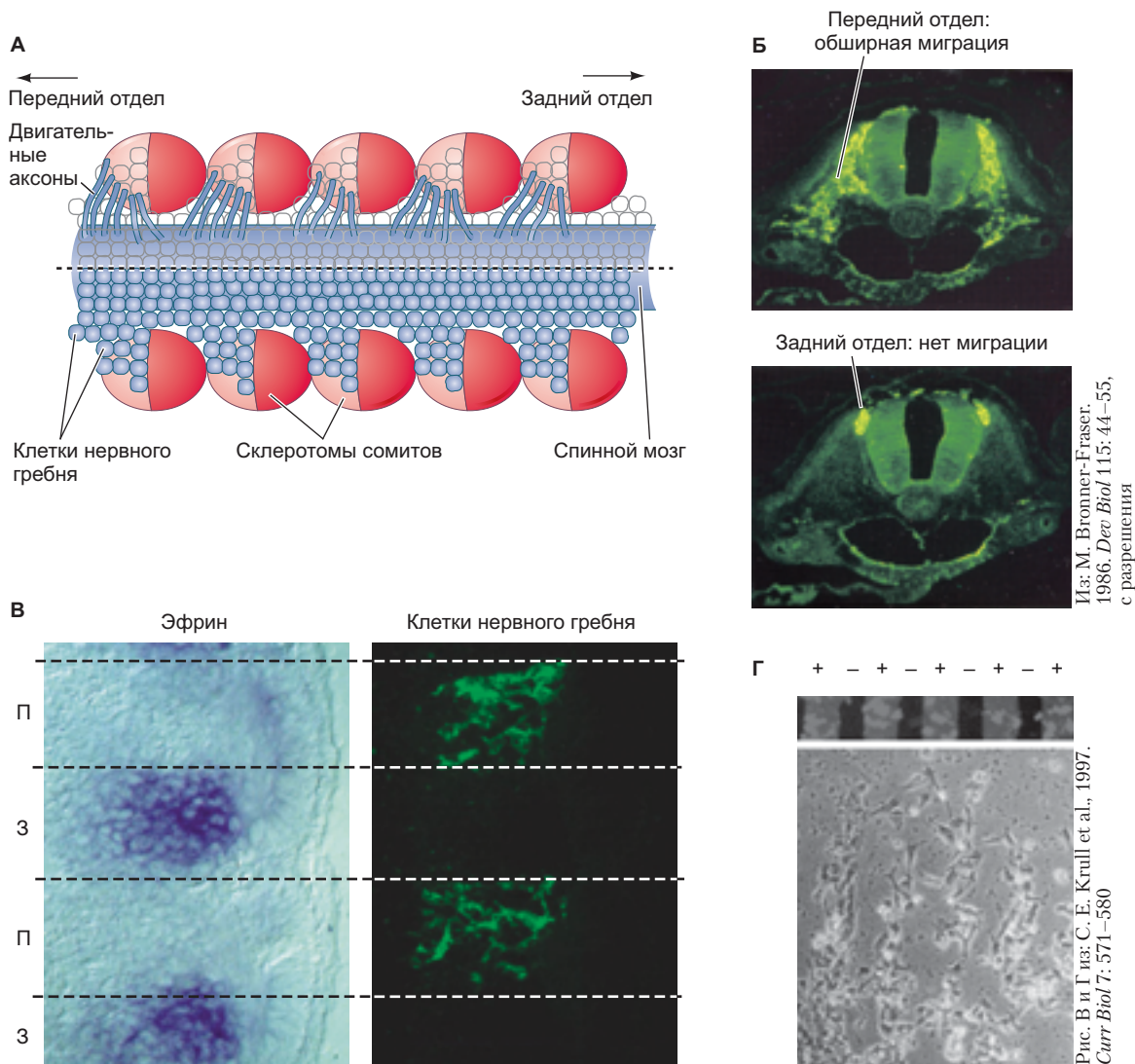


Загадки развития

Энтерические клетки нервного гребня, оказавшись в правильное время в правильном месте, оказывают влияние на траекторию поиска пути нейронами кишки. Что же происходит на самом деле? Экспрессируют ли эти пионерные клетки нервного гребня мембранные рецепторы или секретируют диффундирующие белки, которые инструктируют растущий нейрон к удлинению аксона в направлении клеток нервного гребня? Если энтерические клетки нервного гребня задают путь аксонам, что направляет клетки нервного гребня к каудальному концу кишки, одновременно создавая равномерно распределенный массив нейронов?

Erickson, 2007). Миграцию первых выселяющихся клеток по дорсально-латеральному пути ингибируют хондроитинсульфатсодержащие протеогликаны, эфрины, белки Slit и, возможно, некоторые другие молекулы. Будучи ингибированными, эти клетки разворачиваются и мигрируют вентрально, где дают начало нейронам и глиальным клеткам периферической нервной системы.

Будут эти вентрально мигрирующие клетки мигрировать *между* сомитами (и формировать симпатические ганглии аорты) или *через* сомиты (Schwarz et al., 2009)? У зародыша мыши первые несколько формирующихся клеток нервного гребня проходят между сомитами, но вскоре семафорин-3F-белок блокирует этот путь; поэтому большинство клеток нервного гребня, путешествующие по вентральной



Из: M. Bronner-Fraser.
1986. Dev Biol 115: 44–55,
с разрешения

Пис. В и Г из: C. E. Krull et al., 1997.
Curr Biol 7: 571–580

Рис. 15.14. Ограничение миграции клеток нервного гребня и двигательных нейронов в сегментах, определяемое белками эфринами в склеротоме. **А.** Комбинированная схема миграции клеток нервного гребня и двигательных нейронов (которые впоследствии войдут в состав спинного мозга) через передний участок склеротома, дефицитный по выработке эфрина. (Клетки нервного гребня и двигательные нейроны для простоты показаны с разных сторон спинного мозга; на самом деле обе популяции присутствуют с каждой из сторон.) **Б.** Поперечный срез данной области куриного зародыша, показывающий обширную миграцию в передней части склеротома (*сверху*) и отсутствие миграции в задней его части (*снизу*). Антитела к HNK-1 показаны зеленым. **В.** Отрицательная корреляция между областями экспрессии эфрина в склеротоме (*темно-синее* окрашивание; *слева*) и присутствием клеток нервного гребня (*зеленое* окрашивание антителами к HNK-1; *справа*). **Г.** При посеве клеток нервного гребня перепела на подложку с фибронектином, содержащую перемежающиеся полосы с эфрином и без него, клетки нервного гребня прикрепляются к областям, лишенным эфрина. П — передний отдел; З — задний отдел. (Рис. А по данным: D. D. M. O'Leary and D. G. Wilkinson, 1999. Curr Opin Neurobiol 9: 65–73.)

стороне, мигрируют через сомиты. Эти клетки проходят через *переднюю* часть каждого склеротома (рис. 15.14А) и связываются с такими белками внеклеточного матрикса, как фибронектин и ламинин, которые являются перmissive факторами для их миграции (Newgreen and Gooday, 1985; Newgreen et al., 1986).

Такой характер миграции клеток нервного гребня задает общую сегментированную структуру периферической нервной системы, отражающуюся в положении ганглиев дорсальных корешков и других производных нервного гребня (см. рис. 15.2 и 15.14А).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ЭФРИН КАК РЕПЕЛЛЕНТ ПРИ МИГРАЦИИ КЛЕТОК НЕРВНОГО ГРЕБНЯ

Внеклеточный матрикс склеротома в переднем отделе каждого сомита отличается от такового в заднем отделе, и только внеклеточный матрикс *переднего* отдела склеротома позволяет клеткам нервного гребня мигрировать (рис. 15.14Б). Наподобие молекул внеклеточного матрикса, предотвращающих миграцию клеток нервного гребня дорсально-латерально, внеклеточный матрикс *задней* части каждого склеротома содержит белки, активно не допускающие клетки нервного гребня (рис. 15.14В). Помимо семафорина-3F к этим белкам относят **эфрины**. Эфрин в заднем отделе склеротома распознает его рецептор Eph на клетках нервного гребня. Схожим образом семафорин-3F, секретируемый клетками задней части склеротома, распознает его рецептор нейрокилин-2, расположенный на клетках нервного гребня. При помещении в культуральную чашку с полосами иммобилизованных мембранных белков, чередующихся по наличию или отсутствию эфринов, клетки нервного гребня покидали эфринсодержащие полосы и двигались вдоль полос, лишенных эфрина (рис. 15.14Г; Krull et al., 1997; Wang and Anderson, 1997; Davy and Soriano, 2007) (эфрин и семафорин являются трансмембранными белками. — Прим. перев.).

ФОРМИРУЕМ КИШКУ

Какие из клеток нервного гребня войдут в состав кишки, а какие нет? В разграничении принимают участие составляющие внеклеточного матрикса и растворимые паракринные факторы. Клетки нервного гребня из блуждающего и крестцового отделов формируют ганглии кишечной трубки и контролируют ее перистальтику. Клетки блуждающего нервного гребня, прошедшие через сомиты, входят в состав передней кишки и распространяются по большей части пищеварительной трубки, тогда как клетки крест-

цового нервного гребня заселяют заднюю кишку. Различные ингибиторные белки внеклеточного матрикса (в том числе белки Slit) блокируют миграцию клеток туловищного нервного гребня в кишку по вентральной стороне, но такие ингибиторные белки отсутствуют на уровне блуждающего и крестцового отделов нервного гребня, что позволяет этим клеткам нервного гребня достичь тканей кишки. Рядом с развивающейся кишкой продуцируемый мезенхимой кишки паракринный регулятор **глиальный нейротрофический фактор** (GDNF) вызывает миграцию клеток нервного гребня в пищеварительную трубку (Young et al., 2001; Natarajan et al., 2002). Белок GDNF из мезенхимы кишки связывается со своим рецептором Ret на поверхности клеток нервного гребня. Клетки блуждающего отдела нервного гребня несут большее число молекул Ret на цитоплазматической мембране, чем клетки его крестцового отдела, что делает клетки блуждающего отдела более инвазивными (Delalande et al., 2008).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

«ПОДКЛЮЧЕНИЕ» КИШКИ

Тесные взаимоотношения между нервным гребнем и ищущим мишень аксоном приводят к «подключению» кишки.

Клетки кишечного отдела нервного гребня совершают одно из самых длинных путешествий, поскольку преследуют движущуюся мишень — каудальный, или дистальный, конец растущей кишки. Каудальную миграцию клеток кишечного нервного гребня сравнивают с волной, которая имеет лидирующий (каудальный) «гребень», состоящий из массы клеток (Druckebrod and Epstein, 2007). По мере того как волна продвигается вниз по развивающейся кишке, клетки нервного гребня должны равномерно распределяться по ткани, чтобы обеспечить полную ее иннервацию и функционирование. Процесс, посредством которого клетки кишечного нервного гребня распределяются в кишечнике, называют направленным рассеиванием (Theveneau and Mayor, 2012), однако мало что известно о поведении клеток, опосредующих этот процесс. Клетки кишечного нервного гребня мигрируют не коллективно в составе кластеров, а в виде длинных цепочек (Corpening et al., 2011; Zhang et al., 2012). Более того, с движением волны клетки кишечного нервного гребня мигрируют в случайных на первый взгляд направлениях и обследуют домены вдоль всех осей; в целом, однако, рассеивание преимущественно происходит в направлении заднего конца тела (рис. 15.15А; Young et al., 2014). В ходе этого путешествия клетки кишечного нервного гребня дифференцируются в нейроны, тела и формируемые аксоны которых

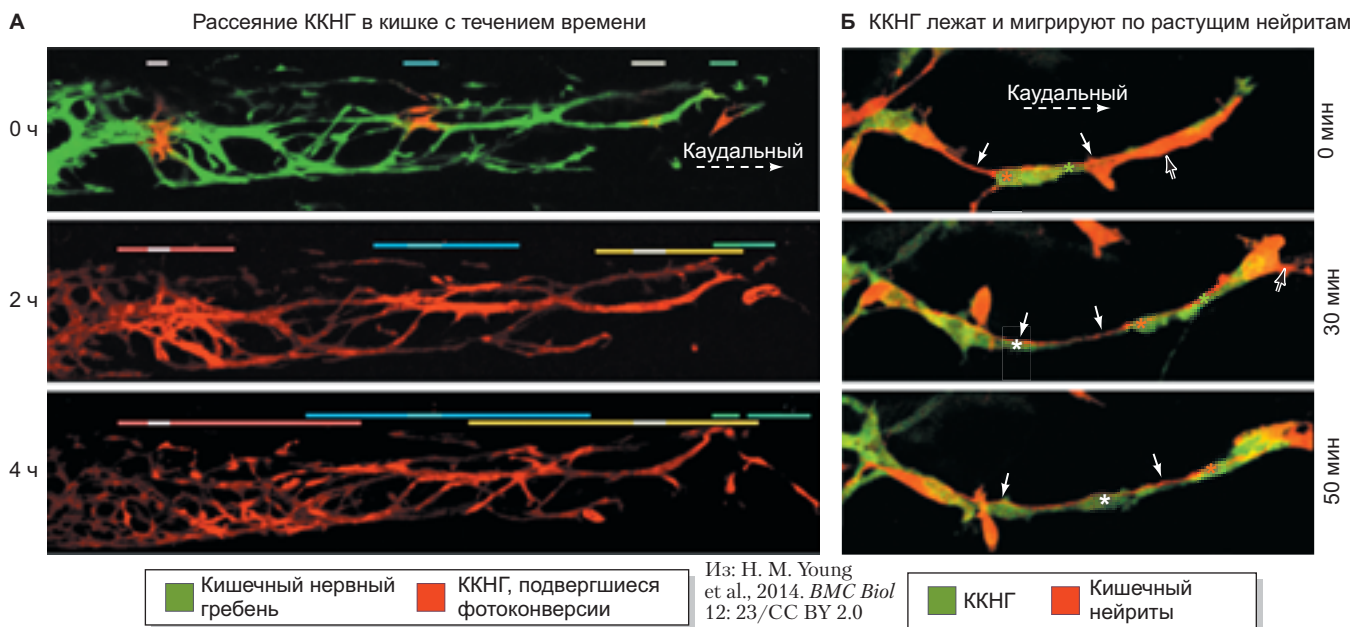


Рис. 15.15. Миграция отдельных клеток кишечного нервного гребня (ККНГ) в развивающейся кишке. Для флуоресцентного мечения кишечного нервного гребня (зеленый) использовали мышей, трансгенных по *Ednrb-hKikGR*. KikGR представляет собой белок, модифицируемый светом; его спектр эмиссии изменяется с зеленого на красный при облучении ультрафиолетом. **А.** Четыре разные точки в развивающейся кишке облучены ультрафиолетом, что повлекло за собой фотоконверсию KikGR (красный; шкалы сверху). Каудальный конец движущейся волны ККНГ находится с правого края фото, сделанного во временной точке 0 ч. Можно видеть рыхло рассеянные ранние цепочки ККНГ в кишке (зеленый; 0 ч.). Клетки, подвергшиеся фотоконверсии, с ходом времени активно мигрируют и рассеиваются преимущественно каудально (2 ч, 4 ч; шкалы увеличивающейся ширины сверху). **Б.** ККНГ (зеленый) можно наблюдать на растущих концах дифференцирующихся нейритов (красный; стрелки). Видно также, что ККНГ используют нейриты как субстрат для миграции (обратите внимание на положение звездочек во времени; по-разному окрашенными звездочками показаны разные клетки)

остаются чрезвычайно подвижными в ходе развития кишки. Любопытно, что можно обнаружить все клетки кишечного нервного гребня мигрирующими вдоль растущего аксона, а также прямо перед его лидирующим краем (рис. 15.15Б). Эти наблюдения наводят на мысли о мутуалистических взаимоотношениях между мигрирующими клетками кишечного нервного гребня и ищущим мишень нейроном кишки; в рамках этих взаимодействий клетки нервного гребня используют аксоны как субстрат для миграции, а аксоны нейронов следуют за клетками-первопроходцами из нервного гребня (Young et al., 2014).

правляют хемотаксические факторы и гликопротеины внеклеточного матрикса (рис. 15.16). У курицы (но не у мыши) первые клетки нервного гребня встают на вентральный путь миграции, тогда как клетки, мигрирующие позже, делают это по дорсально-латеральному пути (Harris and Erickson, 2007). Поздно мигрирующие клетки остаются над нервной трубкой в области, часто называемой плацдармом, и именно они становятся меланобластами (Weston and Butler, 1966; Tosney, 2004).

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК НА ДОРСАЛЬНО-ЛАТЕРАЛЬНОМ ПУТИ

Дорсально-латеральный путь

У позвоночных все пигментные клетки, за исключением таковых в сетчатке, происходят из клеток нервного гребня. Оказалось, что клетки, мигрирующие по дорсально-латеральному пути, уже специфицированы в меланобласты (предшественники пигментных клеток) и что по дорсально-латеральному пути их на-

Похоже, переключение между глиальной/нервной линией дифференцировки и предшественниками меланобластов контролирует транскрипционный фактор Foxd3. При наличии Foxd3 подавлена экспрессия гена транскрипционного фактора MITF, необходимого для спецификации меланобластов и выработки пигмента (см. рис. 15.6). Если же экспрессия Foxd3 подавлена, MITF экспрессируется и клетки стано-

ваются меланобластами. Белок MITF вовлечен в три сигнальных каскада. Первый каскад активирует гены, отвечающие за выработку пигмента; второй позволяет клеткам нервного гребня путешествовать по дорсально-латеральному пути в кожу; третий предотвращает апоптоз в мигрирующих клетках (Kos et al., 2001; McGill et al., 2002; Thomas and Erickson, 2009). У людей, гетерозиготных по *MITF*, меньшее число пигментных клеток достигает середины тела, что проявляется в виде гипопигментированной (белой) полосы в волосяном покрове. У некоторых животных, включая определенные породы собак и лошадей, гетерозиготность по *Mitf* приводит к случайной гибели меланобластов (рис. 15.17).

УПРАВЛЕНИЕ ПОВЕДЕНИЕМ КЛЕТОК НА ДОРСАЛЬНО-ЛАТЕРАЛЬНОМ ПУТИ

Уже в специфицированных меланобластах, находящихся в переходной стадии, увеличиваются уровни экспрессии рецептора эфрина (EphB2) и рецептора эндотелина (EDNRB2). Увеличение экспрессии позволяет меланобластам мигрировать по внеклеточному матриксу, содержащему эфрин и эндотелин-3

(рис. 15.16Б; Harris et al., 2008). Действительно, клетки линии меланоцитов мигрируют, ориентируясь на те же самые молекулы, которые *отталкивают* клетки нервного гребня нервной/глиальной линии. Эфрин, экспрессированный по ходу дорсально-латерального пути миграции, стимулирует миграцию предшественников меланоцитов. Он активирует свой собственный рецептор EphB2 на мембране клеток нервного гребня, и активность Eph-каскада становится критично важна для миграции клеток нервного гребня к месту дифференцировки меланоцитов. Нарушение сигнального пути Eph в поздних мигрирующих клетках нервного гребня предотвращает их дорсально-латеральную миграцию (Santiago and Erickson, 2002; Harris et al., 2008). Недавно была открыта любопытная деталь: определенные породы кур, обладающие белым оперением, являются результатом естественно произошедшей мутации в гене *Ednrb2* (Kinoshita et al., 2014).

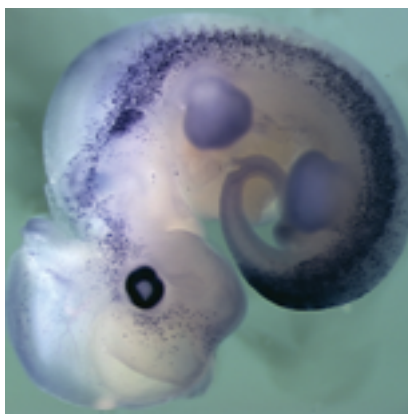
Таким образом, дифференцировку клеток туловищного нервного гребня обеспечивают: 1) автономные факторы (такие как Нох-гены, специфицирующие клетки туловищного и головного нервного гребня, или MITF, направляющий клетки по линии меланоцитов; 2) специфические условия среды (например, кора надпочечника, индуцирующая прилегающие клетки нервного гребня, становиться клетками мозгового вещества надпочечника); 3) комбинация обоих факторов (как происходит, когда клетки, мигрирующие по дорсально-латеральному пути, реагируют на Kit определением поведения и будущего статуса). Судьбу индивидуальной клетки нервного гребня определяет место начала ее миграции (на переднезадней оси вдоль нервной трубки) и путь миграции.

Головной нервный гребень

Голова, включая лицо и череп, наиболее анатомически сложная часть тела позвоночных (Northcutt and Gans, 1983; Wilkie and Morriss-Kay, 2001). В основном она представляет собой результат деятельности клеток головного (черепного) нервного гребня, и эволюция челюстей, зубов и лицевых хрящей происходила путем изменений в расположении этих клеток (см. гл. 24).

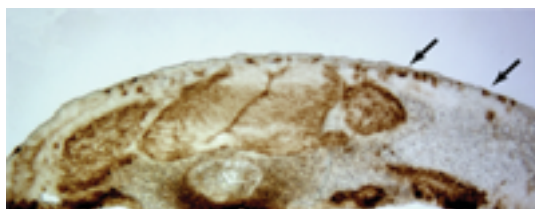
Подобно туловищному нервному гребню, головной гребень может давать пигментные клетки, глиальные клетки и периферические нейроны; но помимо этого он может формировать кость, хрящ и соединительную ткань. Головной нервный гребень представляет собой смешанную популяцию клеток, находящихся на разных стадиях коммитирования, и около 10% популяции состоит из мультипотентных прогениторных клеток, которые способны дифференцироваться в нейроны, глию, меланоциты, мышечные клетки, хрящи и кости (Calloni et al., 2009). У мышей и че-

А



Из: L. L. Baxter and J. Pavan, 2003.
Gene Expr Patterns 3: 703–707

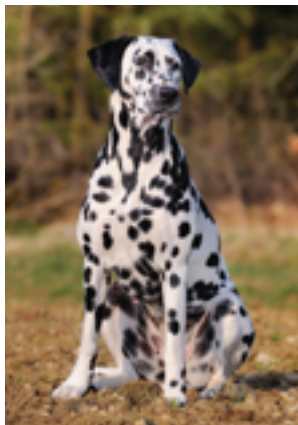
Б



Из: A. Santiago and C. A. Erickson, 2002.
Development 129: 3621–3632, с разрешения C. Erickson

Рис. 15.16. Миграция клеток нервного гребня по дорсально-латеральному пути в коже. **А.** Гибридизация *in situ* на 11-дневном зародыше мыши, выявляющая меланобласты — производные нервного гребня (синий). **Б.** Зародыш курицы на стадии 18, поперечный срез через туловищный отдел. Можно видеть меланобласты (показаны стрелками), движущиеся через дерму, от области нервного гребня к периферии

А



© anetapics/Shutterstock.com

Б



© Mark J. Barrett/Alamy

В



Из: R. A. Fleischman et al.,
1991. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:
10885, с разрешения
R. A. Fleischman

Г



С разрешения:
R. A. Fleischman

Рис. 15.17. Вариации в миграции меланобластов, вызываемые различными мутациями. У некоторых животных случайная гибель меланобластов приводит к пигментации в виде пятен. Мигрирующие меланобласты индуцируют формирование кровеносных сосудов во внутреннем ухе, а без сосудов улитка дегенерирует и животное не может слышать. Это часто можно наблюдать у собак породы далматин (А), гетерозиготных по *Mitf*, и у лошадей породы американский пейнтхорс (Б), которые, как предполагают, гетерозиготны по рецептору эндотелина В. В. Пиебалдизм у ребенка. Образование пигмента нарушено в некоторых областях тела в результате мутации в гене *KIT*. Белок Kit необходим для пролиферации и миграции клеток нервного гребня, предшественников половых клеток и предшественников клеток крови. Г. У мышей тоже встречается мутация *Kit*, и они представляют собой важную модель пиебалдизма и миграции меланобластов

ТАБЛИЦА 15.2. Некоторые производные жаберных дуг у человека

Жаберная дуга	Элемент скелета (нервный гребень + мезодерма)	Дуги, артерии (мезодерма)	Мышцы (мезодерма)	Черепные нервы (нервная трубка)
1	Наковальня и молоточек (из нервного гребня); нижняя челюсть, верхняя челюсть, частично височная кость (из нервного гребня)	Верхнечелюстная ветвь каротидной артерии (в ухе, носу и челюсти)	Челюстные мышцы; дно полости рта; мышцы уха и мягкое нёбо	Верхне- и нижнечелюстной отделы тройничного нерва (V)
2	Стремечко в среднем ухе; шиловидный отросток височной кости; часть гиоидной кости шеи (все — из хрящей нервного гребня)	Артерии ушной области: кортикобарабанная артерия (взрослый); стремени артерия (зародыш)	Мышцы выражения лица; мышцы челюсти и верхней части шеи	Лицевой нерв (VII)
3	Нижний край и большие рога гиоидной кости (из нервного гребня)	Общая каротидная артерия; корень внутренней каротидной артерии	Шилоглоточная (поднимающая глотку)	Языкоглоточный нерв (IX)
4	Хрящи гортани (из боковой пластинки мезодермы)	Дуга аорты; правая подключичная артерия; исходные ветви легочных артерий	Сжиматели глотки и голосовые связки	Верхняя гортанная ветвь блуждающего нерва (X)
6 ^a	Хрящи гортани (из боковой пластинки мезодермы)	Артериальные протоки; корни дефинитивных легочных артерий	Внутренние мышцы гортани	Возвратная гортанная ветвь блуждающего нерва (X)

Источник: W. J. Larsen, 1993. *Human Embryology*. Churchill Livingstone, New York.

^a Пятая пара дегенерирует у человека.

ловека клетки головного нервного гребня выселяются из нервных валиков еще даже до их смыкания (Nichols, 1981; Betters et al., 2010). Последующую миграцию этих клеток направляет сегментация лежащего под ними заднего мозга. Как упоминалось в гл. 13, задний мозг сегментируется по передне-задней оси с образованием отделов, называемых ромбомерами. Клетки головного нервного гребня мигрируют от этих отделов вентрально и вперед от ромбомера 8 в жабер-

ные дуги и лобно-носовой отросток, формирующие лицо (рис. 15.18). Конечное место назначения этих клеток определяет их будущее (табл. 15.2).

Клетки головного нервного гребня следуют одним из трех основных путей:

1. Клетки нервного гребня из среднего мозга и ромбомеров 1 и 2 заднего мозга мигрируют в первую жаберную (мандибулярную) дугу, формируя кости челюсти, а также молоточек и наковальню

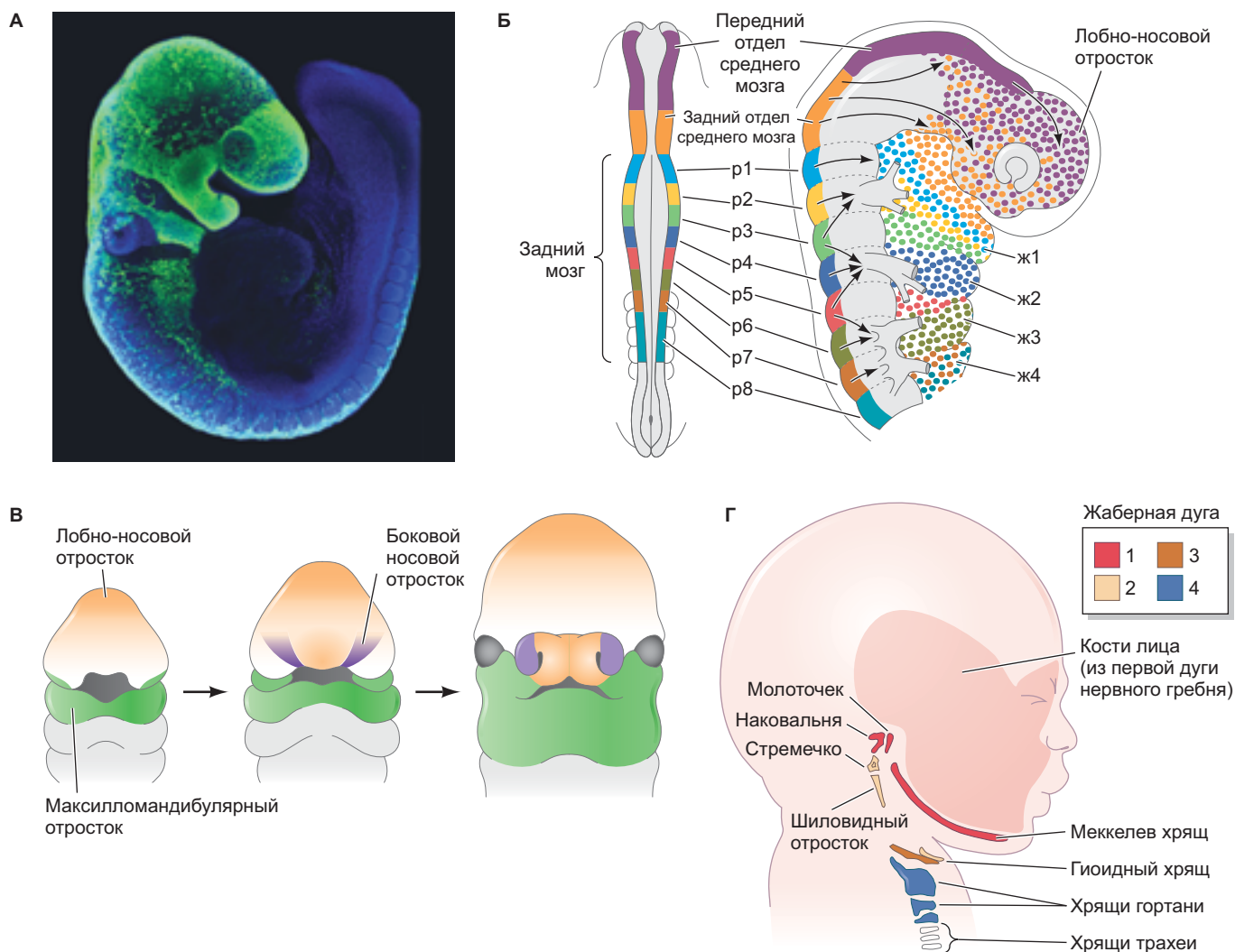


Рис. 15.18. Миграция клеток головного нервного гребня в голове зародыша млекопитающего. **А.** Миграция клеток нервного гребня, меченных с помощью GFP, у 9,5-суточного зародыша мыши, демонстрирующая заселение жаберных дуг и лобно-носового отростка. **Б.** Пути миграции головного нервного гребня к жаберным дугам (ж1–ж4) и лобно-носовому отростку (р, ромбомер). **В.** Продолжение миграции головного нервного гребня обеспечивает формирование лица у человека. Лобно-носовой отросток вносит вклад в построение лба, носа, желобка верхней губы (области между губой и носом) и первичного нёба. Боковой носовой отросток дает крылья носа. Максилломандибулярный отросток дает начало нижней челюсти, большей части верхней челюсти и боковым областям средней и нижней частей лица. **Г.** Структуры лица человека, формируемые мезенхимными клетками нервного гребня. Хрящевые элементы жаберных дуг показаны цветом, и темно-розовая область представляет лицевой скелет, образованный передней областью головного нервного гребня. (Рис. Б по данным: N. M. Le Douarin, 2004. *Mech Dev* 121: 1089–1102; рис. В по данным: J. A. Helms et al., 2005. *Development* 132: 851–861; рис. Г по данным: B. M. Carlson, 1999. *Human Embryology and Developmental Biology*, 2nd Ed. Mosby: St. Louis.)

среднего уха. Эти клетки будут дифференцироваться и в нейроны тройничного ганглия — головного нерва, иннервирующего зубы и челюсти, и будут вносить вклад в цилиарный ганглий, иннервирующий цилиарную мышцу глаза. Клетки нервного гребня тянутся также за распространяющимся эпидермисом, чтобы сформировать лобно-носовой вырост — остеогенную область, которая станет лбом, серединой носа и первичным нёбом. Таким образом, клетки головного нервного гребня дают большую часть скелетных элементов лица (рис. 15.18Б, В; Le Douarin and Kalcheim, 1999; Wada et al., 2011).

2. Клетки нервного гребня из ромбомера 4 заселяют вторую жаберную дугу, формируя верхнюю часть гиоидного хряща шеи, а также стремечко среднего уха (см. рис. 15.18Б, Г). Эти клетки сформируют также нейроны шеи, соединяющиеся с мышцами гортани и языка.
3. Клетки нервного гребня из ромбомеров 6–8 мигрируют в третью и четвертую жаберные дуги и карманы, формирующие нижнюю часть гиоидного хряща, а также входят в состав тимуса, щитовидной и околощитовидных желез (рис. 15.18Б; Serbedzija et al., 1992; Creuzet et al., 2005). Они следуют также в область развивающегося сердца, где помогают строить выносящие сосуды (например, аорту и легочные артерии). Если клетки нервного гребня удалить из этих областей, то указанные структуры не смогут сформироваться (Bockman and Kirby, 1984). Некоторые из клеток мигрируют в каудальном направлении, к ключице, где оседают в местах, используемых в дальнейшем для прикрепления определенных мышц шеи (McGonnell et al., 2001).

Модель «преследуй и беги»

В свете того, как много разных клеточных типов образуется из клеток головного нервного гребня в передней части зародыша, наибольшее внимание уделяется пониманию молекулярных и клеточных механизмов, управляющих миграцией клеток головного нервного гребня в эту область. Напомним, что потоки клеток головного нервного гребня коллективно мигрируют за счет автономного механизма контактного ингибирования локомоции, аттракции друг к другу и слабо-выраженной адгезии (см. рис. 15.12). Но каким же образом каждый из потоков остается обособленным, чтобы двигаться коллективно в правильном направлении? Три потока клеток головного нервного гребня избегают рассеивания благодаря взаимодействию клеток друг с другом и с окружающей их средой. Наблюдения паттернов миграции, происходящей в ромбомерах 3 и 5 заднего мозга курицы, показали, что клетки не мигрируют латерально; скорее, они присоединяются к потокам из ромбомеров с четным

номером, расположенных спереди и сзади от данных нечетных ромбомеров. Миграцию отдельных меченых клеток головного нервного гребня можно отследить с помощью камеры, сфокусированной через окошко в яйце, закрытой тефлоновой мембраной, и такие эксперименты показали, что мигрирующие клетки «держат строй» не только благодаря ограничениям со стороны соседних клеток, но и за счет лидирующих клеток, передающих информацию клеткам сзади. Оказалось, что клетки головного нервного гребня протягивают длинные тонкие отростки, которые на время соединяют клетки и оказывают влияние на миграцию следующих за ними клеток, по образу «следуй за лидером» (Kulesa and Fraser, 2000; McKinney et al., 2011)¹.

Тянитолкай: хитроумное сотрудничество

Недавно проведенный анализ мигрирующих клеток головного нервного гребня у лягушек и рыб показал, что отдельные их потоки остаются разделенными благодаря хемореппеллентным свойствам эфринов и семафоринов и протеогликану верзикану (рис. 15.19А; Szabó et al., 2016). Блокирование активности рецепторов Eph приводит к смешению клеток из разных потоков (Smith et al., 1997; Helbling et al., 1998; Scarpa and Mayoe, 2016). К тому же оказалось, что вентрально направленный поток ведут клетки плакод (Theveneau et al., 2013). Если эксплант клеток головного нервного гребня поместить рядом с эксплантом плакоды, то клетки нервного гребня будут «преследовать» эксплант плакоды; такое клеточное поведение предотвращается нокдауном по CXCR4. Эти и другие данные позволили Тевено с коллегами (2013) предложить модель «преследуй и беги» для объяснения того, как эти взаимодействия приводят к управлению коллективной миграцией.



Загадки развития

Вы уже знаете, что Shh в числе прочего отвечает за аттракцию комиссуральных аксонов к дну нервной трубки. А как насчет сигналов в виде других классических морфогенов? Может ли BMP из дорсальной части нервной трубки влиять на поиск пути аксонами по дорсально-вентральной оси; может ли Wnt, экспрессирующийся в нервной трубке в виде передне-заднего градиента, оказывать влияние на поиск мишени аксона вдоль передне-задней оси?

¹ Мы наблюдали сходный феномен ранее на примере нервных валиков (некоторые клетки которых, возможно, станут клетками нервного гребня) и почки конечности у курицы, бластомеров во время раннего дробления у *Danio rerio* и удлинения микромеров морского ежа.

Было показано, что клетки плакиды секретируют хемоаттрактант SDF1 (stromal-derived factor-1), тем самым устанавливая градиент фактора с максимальной концентрацией в плакоте. Клетки головного нервного гребня экспрессируют рецептор CXCR4

к этому лиганду, позволяющий им ощущать градиент SDF1 и направлять миграцию клеток нервного гребня вверх по градиенту к плакоте («преследуй»). Однако, как только клетки нервного гребня достигают плакиды, контактное ингибирование локомоции

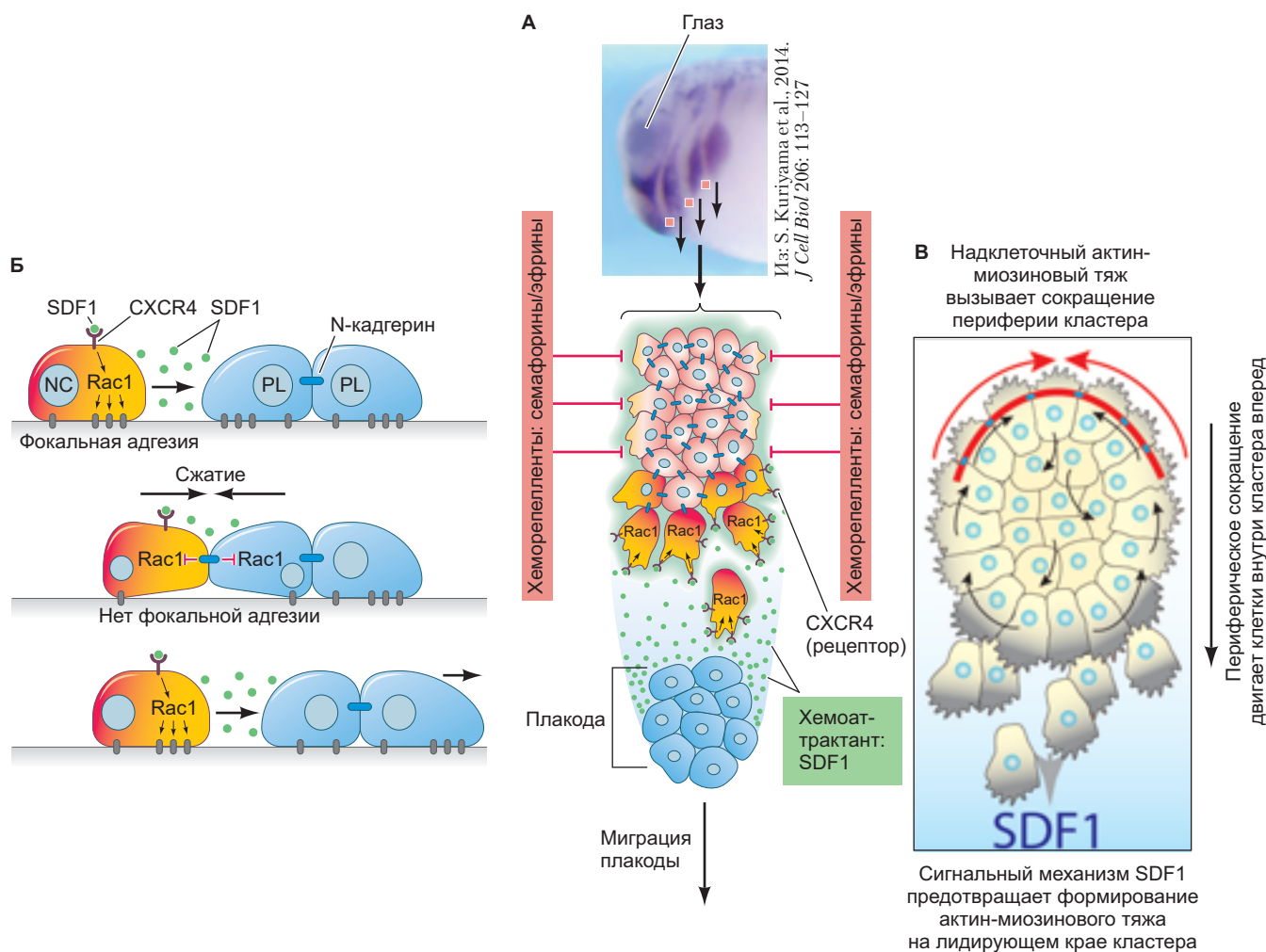


Рис. 15.19. Модель «преследуй и беги», описывающая хемотаксис мигрирующих клеток. **А.** Вид сбоку на потоки клеток головного нервного гребня в голове *Xenopus*, визуализированные с помощью гибридизации *in situ* с зондом к *FoxD3* и *Dlx2* к премигрирующим и мигрирующим популяциям головного нервного гребня (темно-пурпурный). Показана коллективная миграция клеток головного нервного гребня по механизму, описанному на рис. 15.12. Здесь вентрально расположенная плакота (синие клетки) привлекает лидирующий край потока клеток головного нервного гребня за счет сигнального пути SDF1-CXCR4 («преследуй»). Клетки головного нервного гребня контактируют с плакотой и запускают контактное ингибирование, толкающее плакоту вперед («беги»). Хеморепелленты предотвращают рассеяние клеток гребня из кластера в стороны. **Б.** Внутриклеточные молекулярные события и их влияние на поведение клеток, приводящее к миграции вперед клеток плакиды (PL; синий) и головного нервного гребня (NC; красный/желтый). **В.** Движение клеток головного нервного гребня в кластере. Вдоль той стороны кластера, где концентрация SDF1 наиболее высока, сократимые актин-миозиновые тяжи не формируются. Актин-миозиновый тяж в виде единой («надклеточной») структуры формируется в клетках тыловой периферии кластера и функционирует путем стягивания клеток вдоль периферии к задней части кластера, в то время как клетки внутри кластера движутся вперед. Сила сокращения обеспечивает коллективную миграцию клеток головного нервного гребня вперед. (Рис А, Б по данным: E. Theveneau et al., 2013. *Nat Cell Biol* 15: 763–772; E. Scarpa and R. Mayor, 2016. *J Cell Biol* 212: 143–155; рис. В любезно предоставлен Roberto Mayor.)

между ними и клетками плакоды заставляет последние мигрировать прочь от места контакта («беги»). Впрочем, хемоаттрактивный потенциал белка SDF1 снова проявится в виде преследования в вентральном направлении к «убегающей» плакоде (рис. 15.19Б; Theveneau et al., 2013; Scarpa and Mayor, 2016).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

МИГРАЦИЮ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ ПРИВОДИТ В ДЕЙСТВИЕ ЗАДНИЙ ПРИВОД

Несмотря на очевидную необходимость хемоаттрактантов типа SDF1 для обеспечения направленной миграции нервного гребня, собственно механизм, благодаря которому такие хемоаттрактанты работают, до последнего времени оставался неясным. Было показано, что каждый кластер нервного гребня демонстрирует на заднем конце кластера кольцо актин-миозина, организованное между клетками таким образом, будто они — единая структура, сокращающаяся равномерно по периферии кластера. Хемоаттрактант SDF1 ингибирует это сокращение на лидирующем крае кластера, оставляя интактным сокращение в задней его части (рис. 15.19В). Асимметричное сокращение, запускаемое белком SDF1, необходимо и достаточно для направления движения к источнику SDF1. Таким образом, коллективный хемотаксис нервного гребня обусловлен сокращением крайних клеток, напоминая выдавливание тюбика зубной пасты с заднего его конца, что позволяет пасте течь вперед (Shellard et al., 2018; Adameyko, 2018).

? Загадки развития

Мы обсудили прогрессивное созревание клеток туловищного нервного гребня по ходу их миграции. Клетки головного нервного гребня более плотно контактируют друг с другом и подвержены коллективной миграции, что подразумевает участие иных механизмов в регуляции их прогрессивной дифференцировки. Становятся ли клетки, расположенные центрально в общем потоке, паттернированными иначе, нежели клетки с периферии, или же пространственно-временное положение клеток на их маршруте миграции коррелирует с их спецификацией?

Скелет черепа, образующийся из нервного гребня

Череп позвоночного (*cranium*) состоит из мозгового черепа (*neurocranium*; свода черепа и основания

черепа) и лицевого черепа (*viscerocranium*; челюсти и другие производные жаберных дуг). Кости черепа часто относят к интрамембранному типу, так как они образуются путем отложения кальцифицированных спикул непосредственно в соединительной ткани, без хрящевого предшественника. Кости черепа образуются как из нервного гребня, так и из головной мезодермы (Le Lièvre, 1978; Noden, 1978; Evans and Noden, 2006).

Хотя происхождение лицевого черепа из нервного гребня хорошо описано, вклад клеток головного нервного гребня в свод черепа менее понятен. В 2002 г. Джанг с коллегами создали трансгенных мышей, экспрессирующих β-галактозидазу только в клетках головного нервного гребня. Когда зародышей такой мыши окрашивали на β-галактозидазу, клетки, формирующие переднюю часть головы — назальной, фронтальной, алисфеноидной и чешуйчатой костей — окрашивались в синий цвет; парietальная кость черепа не окрашивалась (рис. 15.20А, Б). Граница между костями, происходящими из нервного гребня и из мезодермы, протекает между фронтальной и парietальной костями (рис. 15.20В; Yoshida et al., 2008).

Обычно передняя часть головы формируется из нервного гребня, а задняя часть черепа — из комбинации костей, происходящих из нервного гребня и мезодермы (хотя детали могут различаться у отдельных групп позвоночных). Нервный гребень участвует в формировании лицевых мышц вместе с клетками краниальной мезодермы, т. е. мускулатура лица, возможно, тоже имеет двойственное происхождение (Grenier et al., 2009).

Нервный гребень формирует скелет нашего лица, поэтому даже небольшие вариации в скорости и направлении деления клеток головного нервного гребня будут определять, на что мы похожи. Более того, поскольку мы похожи на наших биологических родителей, эти мельчайшие вариации должны быть наследуемыми.

Регуляцию особенностей внешнего вида нашего лица во многом, возможно, координируют многочисленные паракринные ростовые факторы. Белки BMP (особенно BMP3) и Wnt-каскад вызывают выпячивание лобно-носового и верхнечелюстного отростков, придающих форму лицу (Brugmann et al., 2006; Schoenebeck et al., 2012).

Белки FGF из глоточной энтодермы в свою очередь отвечают за аттракцию клеток головного нервного гребня в дуги, а также за паттернирование скелетных элементов в составе дуг. Fgf8 обеспечивает жизнеспособность клеток головного нервного гребня, а также критичен для пролиферации клеток, формирующих лицевой скелет (Trocovic et al., 2003, 2005; Creuzet et al., 2004, 2005). Факторы FGF работают во взаимодействии с BMP, иногда активируя, а иногда ингибируя их (Lee et al., 2001; Holleville et al., 2003; Das and Crump, 2012).

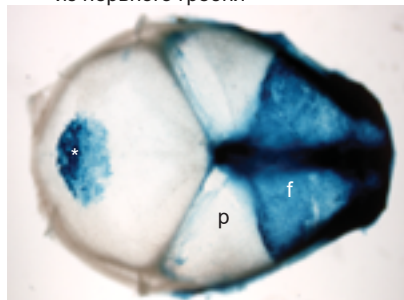
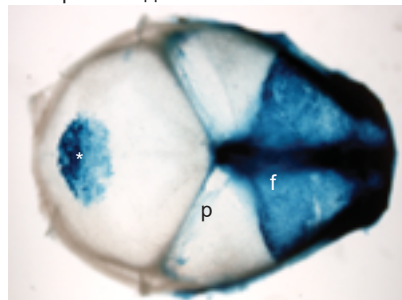
А *Wnt1-Cre*: кости, происходящие из нервного гребня**Б** *Mesp-Cre*: кости мезодермального происхождения

Рис. А и Б из: T. Yoshida et al., 2008. *Mech Dev* 125: 797–808, с разрешения G. Morriss-Kay

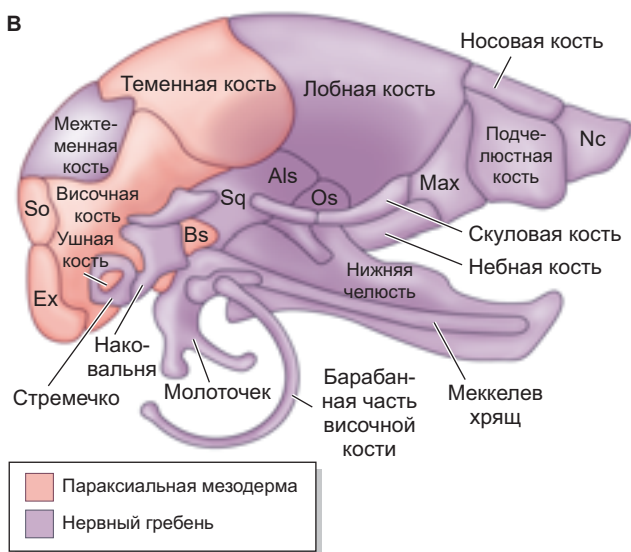
В

Рис. 15.20. Клетки головного нервного гребня у зародыша мыши, окрашенного на экспрессию β -галактозидазы. **А.** У зародышей линии *Wnt1-Cre* β -галактозидаза экспрессируется в тех же клетках, что и *Wnt1* (маркер нервного гребня). Вид с дорсальной стороны на 17,5-дневный зародыш мыши показывает окрашивание в лобной кости (f) и межтеменной кости (p). **Б.** Мыши линии *Mesp-Cre* экспрессируют β -галактозидазу в клетках — производных мезодермы. На фото представлен противоположный паттерн окрашивания, и теменная кость синяя. **В.** Обобщенная схема результатов картирования с помощью маркеров *Sox9* и *Wnt1*. Als — крыло-клиновидная кость (алисфеноид); Bs — основная клиновидная кость; Ex — внезатылочная кость; Max — максилла (верхняя челюсть); Nc — носовая капсула; Os — глазнично-клиновидная кость; So — верхнезатылочная кость; Sq — чешуйчатая часть височной кости. (Рис. В по данным: D. M. Noden and R. A. Schneider, 2006. *Adv Exp Med Biol* 589: 1–23; P. Francis-West et al., 1998. *Mech Dev* 75 (1-2): 3–28.)

Сердечный нервный гребень

Сердце изначально формируется в туловищном отделе непосредственно под жаберными дугами, так что нет ничего удивительного в том, что в его состав входят клетки нервного гребня. И эктодерма, и энтодерма глотки секретируют *Fgf8*, который работает как хемотактический фактор, привлекающий клетки нервного гребня в эту область. Действительно, если шарик, содержащий значительное количество *Fgf8*, поместить дорсально по отношению к глотке у куриного зародыша, то клетки нервного гребня сердца будут мигрировать именно к нему (Sato et al., 2011). Каудальный отдел головного нервного гребня называют сердечным нервным гребнем, так как его клетки (и только эти, определенные клетки нервного гребня) дадут эндотелий артерий дуги аорты и септы между аортой и легочной артерией (рис. 15.21; Kirby, 1989; Waldo et al., 1998). Клетки сердечного нервного гребня входят также в жаберные дуги 3, 4 и 6, чтобы стать частью структур шеи, таких как щитовидная, околощитовидные и вилочковая железы. Эти клетки часто упоминают как окологлоточный гребень (Kuratan and Kirby, 1991, 1992). В тимусе клетки — производные нервного гребня особенно важны для выполнения одной из главных функций адаптивного

иммунитета — регуляции выхода зрелых Т-клеток из тимуса в циркулирующий кровоток (Zachariah and Cyster, 2010). Похоже также, что каротидное тельце, контролирующее уровень кислорода в крови и соответственно регулирующее дыхание, происходит из клеток сердечного нервного гребня (Pardal et al., 2007).

Установление аксональных путей в нервной системе

В начале XX в. появилось много конкурирующих теорий о том, как формируются аксоны. Теодор Шванн (да, именно тот, кто открыл Шванновские клетки) верил, что многочисленные нервные клетки связываются друг с другом в цепь, формируя аксон. Виктор Ганзен, открывший эмбриональный узелок у птиц, думал, что аксон формируется вокруг существующих цитоплазматических нитей между этими клетками. Вильгельм Гис (1886) и Сантьяго Рамон-и-Кахаль (1890) тоже постулировали, что представляет собой отросток (хоть и невероятно длинный) тела нейрона.

В 1907 г. Росс Гранвилл Гаррисон продемонстрировал истинность теории отростка в элегантном эксперименте, давшем начало нейробиологии развития

и технике культуры тканей. Гаррисон изолировал участок нервной трубки трехмиллиметрового голо-вастика. (На этой стадии, вскоре после смыкания нервной трубки, видимая дифференцировка аксонов отсутствует.) Поместил ткань, содержащую нейро-бласты, в каплю лимфы лягушки на покровном стекле и, перевернув стекло каплей вниз, закрыл им лунку в предметном стекле, так что мог наблюдать, что происходит в висячей капле. То, что Гаррисон увидел, оказалось появлением аксонов в виде вы-ростов из нейробластов, удлиняющихся примерно на 56 мм в час.

Непохожие на большинство клеток, нейроны не ограничены пространством, непосредственно ими занимаемым; наоборот, они способны формировать аксоны, которые могут удлиняться на метры. Каж-дый из 86 млрд нейронов в мозге человека способен взаимодействовать специфическим образом с ты-сячами других нейронов (рис. 15.22; Azevedo et al., 2009). Крупный нейрон (такой как клетка Пуркинье или моторный нейрон) может принимать сигналы от более чем 10^5 других нейронов (Gershon et al., 1985). Понимание создания этой потрясающе упо-рядоченной сложности является одним из величай-

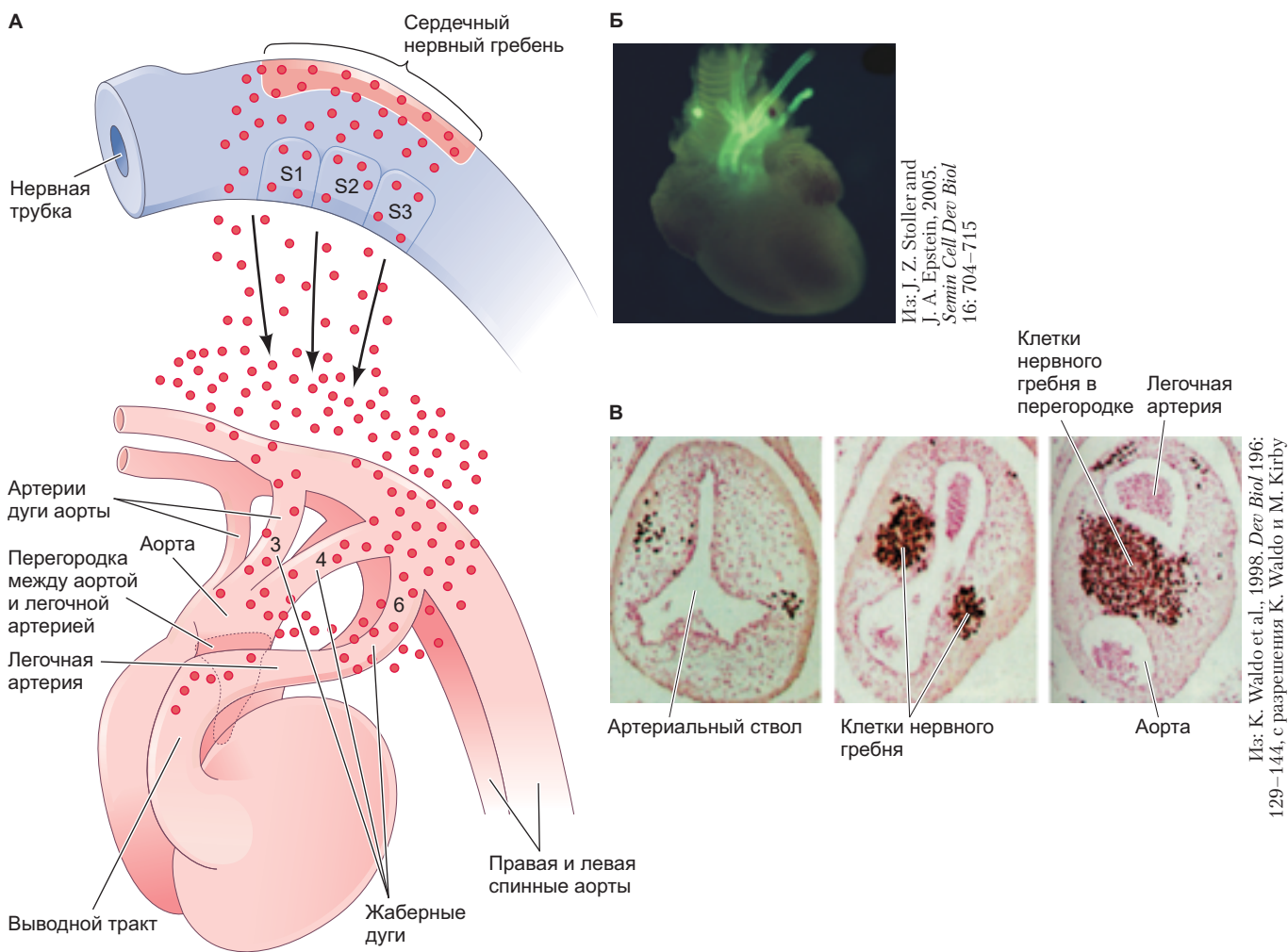


Рис. 15.21. Перегородка сердца, разделяющая артериальный ствол на легочную артерию и аорту, формируется из клеток сердечного нервного гребня. **А.** На пятой неделе гестации у плода человека клетки нервного гребня сердца мигрируют, заселяют жаберные дуги 3, 4 и 6 и входят в артериальный ствол, чтобы сформировать перегородку (S1, S2 и S3 — сомиты 1, 2 и 3). **Б.** У трансгенных мышей, экспрессирующих GFP в клетках, содержащих маркер Pax3 клеток сердечного нервного гребня, выносящая часть сердца становится меченой. **В.** Клетки сердечного нервного гребня перепела были трансплантированы в аналогичную область куриного зародыша, после чего зародыш развивался далее. Клетки сердечного нервного гребня перепела были выявлены с помощью антител к антигену, специфичному для перепела (показано темным). В сердце они видны как популяция клеток, разделяющих артериальный ствол на легочную артерию и аорту. (Рис. А по данным: M. R. Hutson and M. L. Kirby, 2007. *Cell Dev Biol* 18: 101–110.)

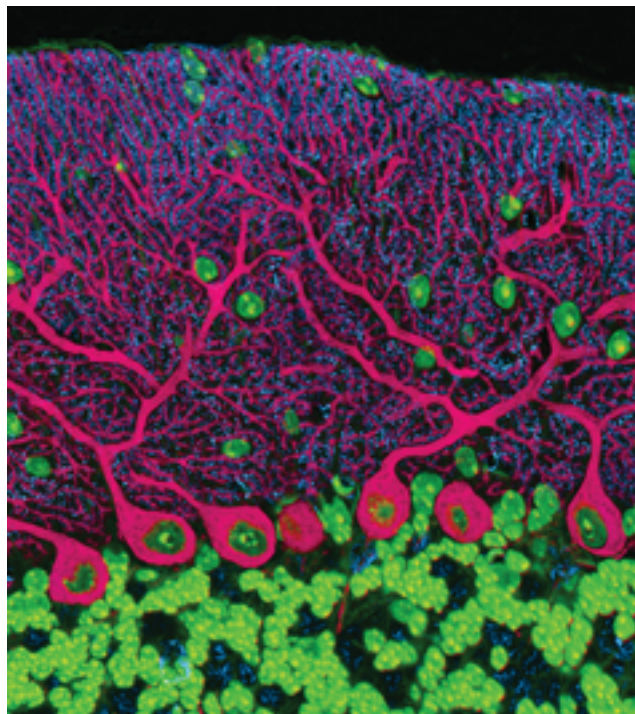
ших вызовов современной науке. Как происходит становление сложных схем? Мы будем разбираться в этом вопросе по мере дискуссии о том, как нейроны удлиняют свои аксоны, как аксоны ищут свою клетку-мишень, как формируются синапсы и что определяет, выживет нейрон или погибнет.

Конус роста: водитель и двигатель аксона в поиске мишени

Ранее в этой главе мы уже обращались к аналогии миграции клеток и навигации автомобиля в потоке уличного движения (см. рис. 15.7). Схожая аналогия может быть использована для процесса поиска аксоном своей мишени, путем сравнения его с движущимся поездом. Нейрону нужно построить через аксон связь с клеткой-мишенью, которая может лежать на значительном расстоянии от него. Подобно локомотиву поезда, *локомоторный* аппарат аксона — **конус роста** — находится на его переднем конце, и, как новые вагоны, прицепляемые позади локомотива, аксон растет благодаря полимеризации микротрубочек (**рис. 15.23А**). Конус роста был назван «клеткой нервного гребня на поводке», так как он, подобно клетке нервного гребня, мигрирует и воспринимает свое окружение. Более того, он отвечает на те же типы сигналов, которые воспринимает мигрирующая клетка.

Конус роста движется не вперед по прямой, а «ощупывает» свой путь по субстрату. Он перемещается путем удлинения и сокращения тонких филоподий, называемых **микрошипами** (рис. 15.23Б). Микрошипы содержат микрофиламенты, ориентированные параллельно длинной оси аксона. (Этот механизма похож на механизм, наблюдаемый в цитоскелете филоподий клеток вторичной (скелетогенной) мезенхимы у иглокожих; см. гл. 10). Внутри самого аксона структурную поддержку обеспечивают микротрубочки (Yamada et al., 1971; Forscher and Smith, 1988).

Как и в большинстве мигрирующих клеток, исследующие микрошипы конуса роста прикрепляются к субстрату и прилагают силу, чтобы подтянуть остальную клетку вперед. Аксон не будет расти, если конус роста не сможет продвигаться вперед (Lamoureaux et al., 1989). В дополнение к их структурной роли в миграции аксона микрошипы выполняют сенсорную функцию. Распластываясь впереди конуса роста, каждый микрошип «пробует» свое микроокружение и посылает сигналы назад, к телу клетки (Davenport et al., 1993). Навигация аксонов в направлении их соответствующих мишеней зависит от путеводных молекул во внеклеточном окружении, и от конуса роста, который поворачивает или не поворачивает в ответ на подсказки, поскольку аксон стре-



© Dr. Thomas Deerinck/Visuals Unlimited, Inc.

Рис. 15.22. Звездное небо синаптических контактов на дендритах Пуркинью в мозжечке мыши. Эта фотография показывает, как сложен массив дендритов, которые отходят от каждого нейрона Пуркинью (*красный*) и принимают информацию от других нейронов через сотни синапсов (*синий*). ДНК показана зеленым

мится установить соответствующий синаптический контакт. В основе такой различной способности отвечать на сигналы лежит дифференциальная экспрессия рецепторов на мембране конуса роста. Конусы роста способны воспринимать окружающую среду и транслировать внеклеточные сигналы в направленное движение (рис. 15.23В). Использование направленных сигналов для упрощения специфической миграции сопровождается перестройками цитоскелета, изменениями роста мембраны и координации клеточной адгезии и движения клетки (Vitriol and Zheng, 2012).

Rho действует на актиновые филаменты под влиянием сигнальных каскадов

Регуляция полимеризации актина управляет движением конуса роста, и поэтому многие механизмы молекулярной навигации обусловлены именно ей. Rho-ГТФазы регулируют рост актиновых филаментов. ГТФазы могут быть активированы или ингибированы рецепторами, связывающими эфрины, нетрины, белки Slit или семафорины (**рис. 15.24А**). Регуляция полимеризации тубулина в микротру-

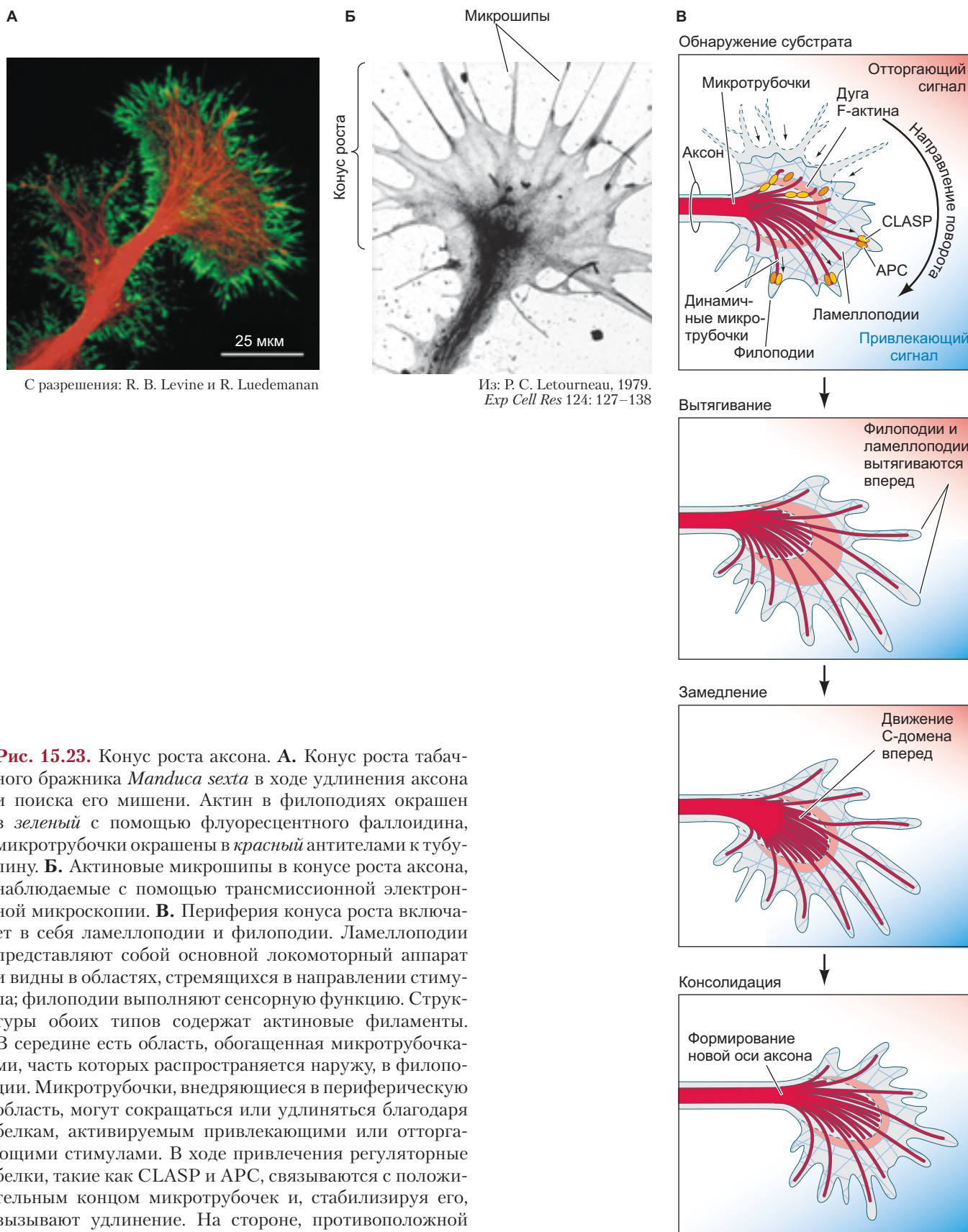


Рис. 15.23. Конус роста аксона. **А.** Конус роста табачного бражника *Manduca sexta* в ходе удлинения аксона и поиска его мишени. Актин в филоподиях окрашен в *зеленый* с помощью флуоресцентного фаллоидина, микротрубочки окрашены в *красный* антителами к тубулину. **Б.** Актиновые микрошпицы в конусе роста аксона, наблюдаемые с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. **В.** Периферия конуса роста включает в себя ламеллоподии и филоподии. Ламеллоподии представляют собой основной локомоторный аппарат и видны в областях, стремящихся в направлении стимула; филоподии выполняют сенсорную функцию. Структуры обоих типов содержат актиновые филаменты. В середине есть область, обогащенная микротрубочками, часть которых распространяется наружу, в филоподии. Микротрубочки, внедряющиеся в периферическую область, могут сокращаться или удлиняться благодаря белкам, активируемым привлекающими или отторгающими стимулами. В ходе привлечения регуляторные белки, такие как CLASP и APC, связываются с положительным концом микротрубочек и, стабилизируя его, вызывают удлинение. На стороне, противоположной привлекающему сигналу, микротрубочки на периферии разбираются. С-домен — центральный домен конуса роста, содержит микротрубочки, отвечающие за удлинение оси аксона. (рис. В по данным: L. A. Lowery and D. Van Vactor, 2009. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 332–343.)

бочки важна потому, что полимеризация тубулина происходит на стороне конуса роста под действием сигнала-аттрактанта и ингибируется (поскольку тубулин деполимеризуется и используется повторно) на стороне, противоположной стимулу аттрактанта (Vitriol and Zheng, 2012).

Считается, что адгезия обеспечивает «сцепление» для направленного движения. Визуализированный актин оказался связан с мембраной клетки. Теперь представьте, что динамика сборки и разборки актина приводит к ретроградному потоку актина, т. е. актин движется от конца конуса роста в направлении тела клетки (*treadmilling*; рис. 15.24Б). Однако, если мембрана клетки при этом связана с наружными адгезионными молекулами (через интегрины или кадгерины), она будет двигаться вперед благодаря тредмиллингу актина (Bard et al., 2008; Chan and Odde, 2008). Если же такой закоривающей адгезии нет, то не может быть никакого результирующего движения. Важно, однако, что если адгезия слишком стабильная, то конус роста прекратит движение. Таким образом, чтобы конус роста двигался

динамично, адгезия должна появляться и исчезать. Такие переходные адгезивные комплексы обусловлены **точечной (фокальной) адгезией** и связывают внутренний актин с внеклеточной окружающей средой. Фокальные контакты могут содержать вплоть до 100 компонентов (Geiger and Yamada, 2011), и один из них — киназа фокальной адгезии (FAK), критичная для сборки, стабилизации и деградации фокальных контактов (Mitra et al., 2005; Chacon and Fazzari, 2011).

Наведение аксона

Как конус роста может «знать», какие из потенциальных клеток-мишеней можно обойти, а с какой установить специфичный контакт? Гаррисон (1910) впервые предположил, что специфичность аксонального роста основана на **пионерных нервных волокнах** — аксонах, которые растут раньше и действуют как проводники для остальных. Это наблюдение

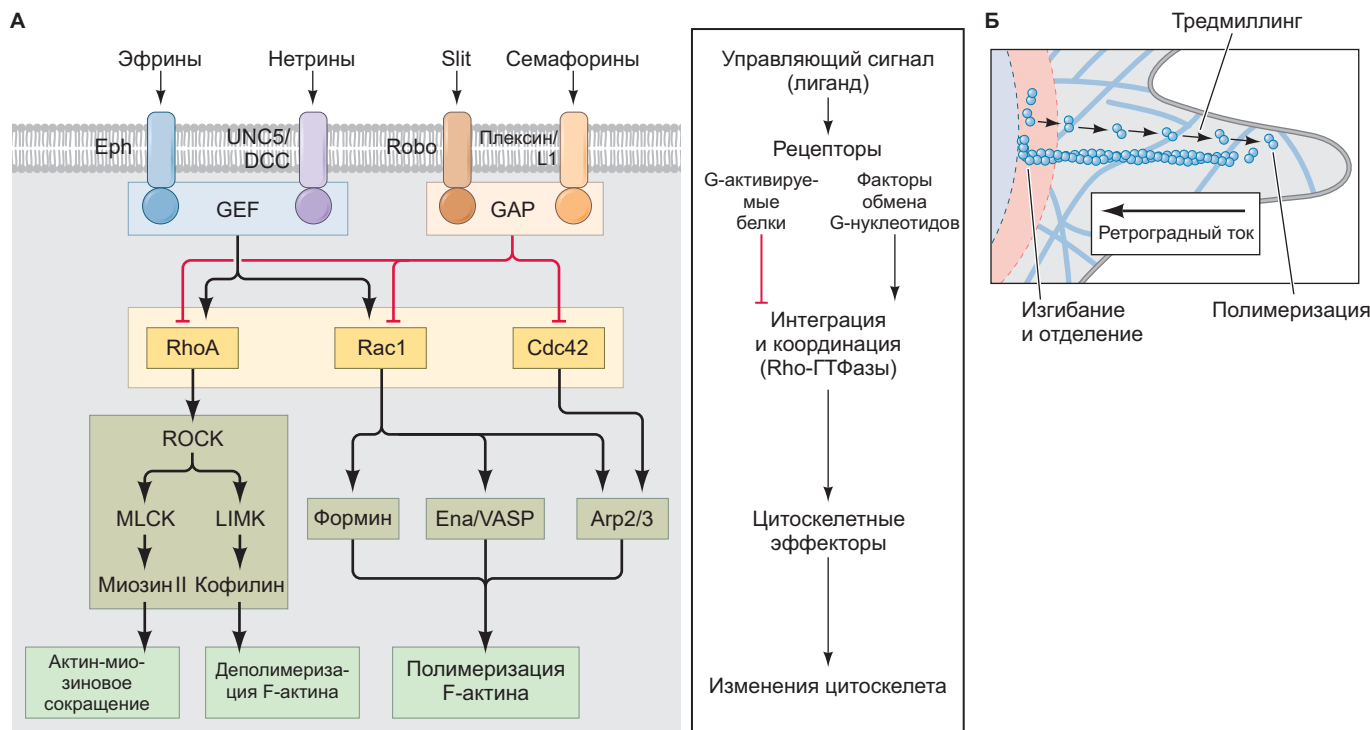


Рис. 15.24. Rho-ГТФазы воспринимают и переключают внешние управляющие сигналы на актиновый цитоскелет. **А.** Четыре главных лиганда, выступающие в качестве путеводителей для конуса роста (эфрины, нетрины, Slit и семафорины), связываются с рецепторами, которые стабилизируют или дестабилизируют актиновые филаменты. Семейство Rho из числа ГТФаз (RhoA, Rac1 и Cdc42) работают как посредники между рецепторами и молекулами, вызывающими изменения цитоскелета. **Б.** Схема, иллюстрирующая тредмиллинг актина, в ходе которого положение молекул-мономеров актина «течет» от положительного конца филамента к отрицательному из-за направленной полимеризации и деполимеризации. (Рис. А по данным: L. A. Lowery and D. Van Vactor, 2009. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 332–343; рис. Б по данным: G. M. Cammarata et al., 2016. *Cytoskeleton* 73: 461–476.)

упрощает, но не решает проблему того, как нейроны формируют правильный паттерн взаимосвязей. Гаррисон также отметил, что аксоны должны расти по твердому субстрату, и предположил, что различия в тканях эмбриона могут позволять аксонам путешествовать в каких-то определенных направлениях. Итоговый контакт будет происходить благодаря комплементарным взаимодействиям на поверхности клетки-мишени:

Должна быть некая поверхностная реакция между каждым типом нервного волокна и конкретной структурой, которую необходимо иннервировать, и это очевидно из того факта, что сенсорные и моторные волокна, хотя и идут очень близко друг к другу в составе пучка, все же образуют на периферии правильные соединения — один с эпидермисом, другой с мышцей... Вышеупомянутые факты свидетельствуют о том, что здесь может быть определенная аналогия с объединением яйца и спермия.

Исследования специфичности нейронных взаимодействий были сфокусированы на трех основных системах: 1) моторных нейронах, аксоны которых идут от спинного мозга к конкретным мышцам; 2) комиссуральных нейронах, аксоны которых должны пересечь плоскость средней линии зародыша, чтобы иннервировать мишени на противоположной стороне центральной нервной системы; 3) зрительной системе, в которой аксоны, начинающиеся в сетчатке, должны найти свой путь обратно в мозг. Во всех случаях специфичность аксонных соединений разворачивается в три этапа (Goodman and Shatz, 1993):

1. **Выбор пути.** Аксоны следуют по маршруту, который приводит их в конкретную область зародыша.
2. **Выбор мишени.** Аксоны, достигнув нужной области, распознают и связываются с группой клеток, с которой они могут установить стабильное соединение.
3. **Выбор адреса.** Начальный паттерн уточняется так, что каждый аксон связывается с небольшой подгруппой (а иногда всего одной) из своих возможных мишеней.

Первые два процесса не зависят от активности нейронов. Третий процесс осуществляет взаимодействие между несколькими активными нейронами и конвертирует накладывающиеся проекции в тонко настроенный паттерн соединений.

Каким образом аксоны нейронов узнают, куда идти?

Внутреннее программирование навигации моторных нейронов

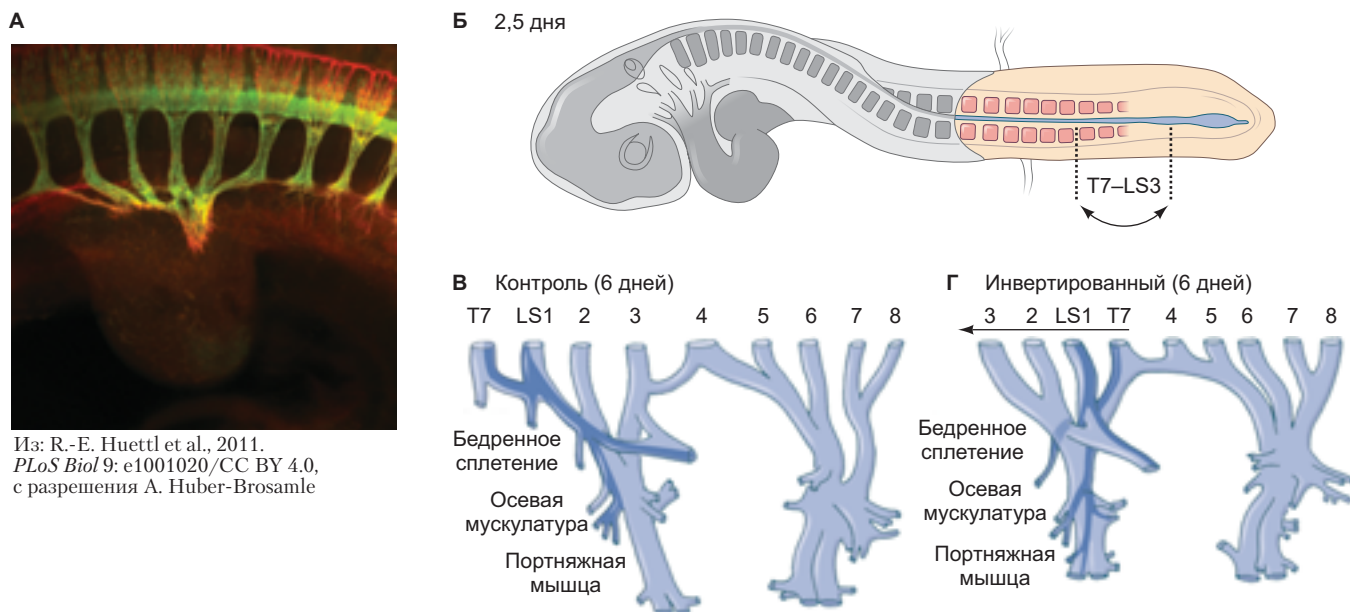
Нейроны на вентролатеральном крае нервной трубки позвоночных становятся моторными нейронами, и один из первых шагов к их созреванию заключается

в определении специфичности мишени (Dasen et al. 2008). Тела клеток двигательных нейронов, иннервирующих отдельную мышцу, группируются в столб спинного мозга (рис. 15.25А; Landmesser 1978; Hollyday 1980; Price et al. 2002). Группы тел клеток объединяются в столбы Терни, а также латеральные и медиальные моторные столбы (ЛМС и ММС соответственно), при этом нейроны, занимающие схожее положение, имеют схожее мишени (см. рис. 13.15В). Например, моторные нейроны ЛМС в заднем мозге курицы иннервируют спинную мускулатуру, тогда как моторные нейроны ММС иннервируют вентральные мышцы конечности (Tosney et al., 1995; Polleux et al., 2007). Такое расположение моторных нейронов характерно для всех позвоночных.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Механизм, направляющий Lim-специфичные моторные нейроны к их мышечным мишеням

Мишени моторных нейронов определяются еще до того, как их отростки достигают периферии. Это показали Ланс-Джонс и Лэндмессер (1980), перевернув сегменты спинного мозга курицы таким образом, что моторные нейроны оказались в новом положении. Аксоны стали расти к своим прежним мишеням, а не к возможным другим мишеням, исходя из нового положения нейронов (рис. 15.25Б–Г). Молекулярную основу специфичности мишеней обеспечивают члены семейств белков Нох и Lim, индуцируемых в ходе спецификации нейронов (Tsushida et al., 1994; Sharma et al., 2000; Price and Briscoe, 2004; Bonanomi and Pfaff, 2010). Например, все моторные нейроны экспрессируют Lim-белок Islet1 и (несколько позже) Islet2. Если никакие другие Lim-белки не образуются, то нейроны нацеливаются на вентральные мышцы конечности (рис. 15.26), поскольку аксоны (как клетки туловищного нервного гребня) синтезируют нейропиплин-2, рецептор к хеморецеплен-ту семафорин-3F, образующемуся в дорсальной части почки конечности. Однако в случае, если синтезируется и белок Lim1, моторные нейроны посылают отростки в дорсальном направлении, к дорсальным мышцам конечности. Рост аксона к дорсальной мускулатуре происходит потому, что Lim1 индуцирует экспрессию EphA4, являющегося рецептором к хеморецеплен-ту эфрину A5, синтезируемому в вентральной части почки конечности. Таким образом, иннервация почки моторными нейронами зависит от отталкивающих сигналов. Однако моторный нейрон, входящий в аксиальную мускулатуру стенки тела, привлекается туда с помощью хемоаттракции: эти аксоны делают крутой поворот, чтобы попасть в развивающуюся



Из: R.-E. Huettl et al., 2011.
PLoS Biol 9: e1001020/CC BY 4.0,
 с разрешения A. Huber-Brosamle

Рис. 15.25. Компенсация небольших нарушений начального положения аксона у куриного зародыша. **А.** Аксоны двигательного и сенсорного нейронов группируются в пучок, до того как найдут свою мышцу-мишень. На фотографии двигательный нерв (окрашенный в *зеленый* благодаря GFP) входит в состав пучка, до того как проникнет в почку конечности 10,5-дневного зародыша мыши. **Б.** Вид сбоку на спинной мозг, в частности на участок сегментов T7–LS3 (от седьмого грудного до третьего пояснично-крестцового), инвертированный у 2,5-дневного зародыша. **В.** Нормальный паттерн проекции аксонов на мышцы передней конечности на стадии 6 дней. **Г.** Проекция аксонов из перевернутого сегмента спинного мозга на стадии 6 дней. Нейроны, оказавшиеся в неверном положении, в конце концов находят свой путь и иннервируют надлежащую мишень. (Рис. Б–Г по данным: C. Lance-Jones and L. Landmesser, 1980. *J Physiol* 302: 581–602.)

мускулатуру, поскольку данные моторные нейроны экспрессируют *Lhx3*, который индуцирует экспрессию рецептора к FGF, секретируемого дермомиотомом (область сомита, содержащая мышечные клетки-предшественники; см. гл. 17). Данный процесс служит примером того, как классический морфоген (FGF) работает и для направления аксона в том порядке, который в классическом понимании приписывают направляющим молекулам. Мы вернемся к этому вопросу позже в данной главе. В общем, моторные нейроны стремятся к своим мишеням благодаря «внутренним» программам, которые обеспечивают разные моторные нейроны определенными поверхностными молекулами, что в свою очередь помогает ростовому конусу отвечать на сигналы-подсказки, направляющие его на пути к своей мишени.

Клеточная адгезия: механизм, чтобы удержаться на пути

Первоначальный путь, которому следует конус роста аксона, определяет среда, в которой конус ро-

ста находится. Полярность нейрона, т. е. то, какая часть клетки отрастит аксон, обусловлена в основном ответом нейрона на адгезионные сигналы, поступающие непосредственно из среды. Интегрины и N-кадгерины работают как рецепторы, чтобы сориентировать нейрон в соответствии с сигналами внеклеточного матрикса (ВКМ) и мембран окружающих клеток (Myers et al., 2011; Randlett et al., 2011; Gärtner et al., 2012; Ligon et al., 2001). Как только аксон начинает формироваться, его конус роста сталкивается с разными субстратами. Он прикрепляется к определенным субстратам и движется в их направлении. Другие субстраты вызывают сокращение конуса роста, предотвращая рост аксона в их направлении. Конус роста предпочитает мигрировать по поверхностям более адгезивным, чем их окружение, и дорожки адгезивных молекул (таких как ламинин) могут направлять его к мишени (Letourneau, 1979; Akers et al., 1981; Gundersen, 1987). В дополнение к взаимодействию «клетка–ВКМ», существуют важные межклеточные адгезионные контакты, которые могут обеспечивать перmissive субстрат для движения конуса роста.

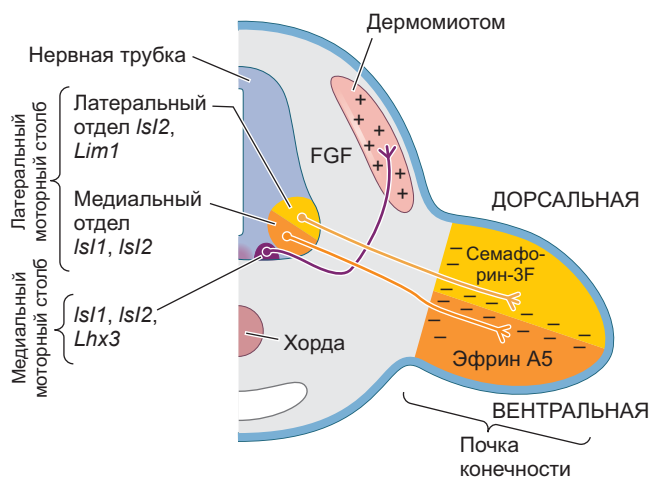


Рис. 15.26. Положение двигательных нейронов и их спецификация за счет Lim-белков в спинном мозге, иннервирующем заднюю конечность зародыша курицы. Нейроны каждого из трех столбов экспрессируют специфичный набор генов семейства Lim (включая *Isl1* и *Isl2*), а нейроны в пределах каждого из столбов принимают схожие решения по выбору пути поиска мишени. Нейроны медиального моторного столба привлекают осевая мускулатура за счет FGF, секретируемых дермомиотомом. Нейроны латерального моторного столба отправляют аксоны к мускулатуре конечности. После разделения этих столбов средний отдел проецирует аксоны в вентральном направлении, так как их отторгает семафорин-3F, выделяемый на дорсальной стороне почки конечности; латеральные отделы посылают аксоны в дорсальную область почки конечности, поскольку их отторгает эфрин А5, синтезируемый в вентральной половине. (Рис. А по данным: F. Polleux et al., 2007. *Nat Rev Neurosci* 8: 331–340.)

Местные и далекодействующие направляющие молекулы: дорожные знаки для зародыша

Навигация внутри зародыша в буквальном смысле осуществляется за счет молекул, чьи функции скорее напоминают сигналы светофоров, дорожные знаки и другие подсказки, которые мы используем, чтобы найти путь в нашей собственной среде обитания. Исследователи интерпретировали многие из решений, принимаемых конусом роста во время его путешествия, как эквивалент выбора между привлечением и отталкиванием от конкретной области зародыша (см. рис. 15.23). Сигналы, вызывающие ответ в виде привлечения или отталкивания растущего аксона, происходят из четырех семейств белков: эфрины, семафорины, нетрины и белки Slit; в некотором смысле это те же белки, что регулируют миграцию клеток нервного гребня (Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011). Будет направляющий сигнал привлекающим или отталкивающим, определяет: 1) тип клеток, воспри-

нимающих сигнал; 2) момент времени, когда клетка получает этот сигнал. Самое интересное, что в развитии нервной системы задействован динамичный механизм, меняющий способность конуса роста реагировать на сигналы и позволяющий конусу роста избегать сигналов, ранее им игнорируемых или которые его активно привлекали.

Паттерн избегания: эфрины и семафорины

Члены двух семейств мембранных белков эфрины и семафорины наиболее (но не досконально) изучены в связи с их действием в качестве отталкивающих сигналов, участвующих в паттернировании структуры аксона. Как только миграция клеток нервного гребня через заднюю часть склеротома будет ингибирована, аксоны из ганглиев дорсальных корешков и от моторных нейронов точно так же будут мигрировать через переднюю часть каждого склеротома, избегая при этом миграции через заднюю его область (рис. 15.27А; см. также рис. 15.14). Дейвс с коллегами (1990) показали, что мембраны клеток, изолированные из задней части сомита, вызывают сокращение конуса роста этих нейронов (рис. 15.27Б, В). Конусы роста содержат рецепторы Eph (связывающие эфрины) и рецепторы нейропилины (связывающие семафорины) и способны взаимодействовать с эфринами и семафоринами на поверхности клеток задней части склеротома (Wang and Anderson, 1997; Krull et al., 1999; Kuan et al., 2004). Таким образом, те же самые сигналы, которые направляют миграцию клеток нервного гребня, определяют и удлинение отростков спинальных нейронов.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

СЕМАФОРИНЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ СЖАТИЕ КОНУСА РОСТА

Белки семейства семафорина-3, известные как коллапсины, обнаружены у млекопитающих и птиц. Эти секретируемые белки вызвали сокращение конуса роста аксонов, идущих из ганглиев дорсальных корешков (Luo et al., 1993). В ганглиях дорсальных корешков присутствует несколько типов нейронов, аксоны которых входят в дорсальную часть спинного мозга. Большинство из них защищено от путешествия дальше и входит в вентральную часть спинного мозга, однако часть их движется вентрально, через другие клетки нервной природы (рис. 15.28). Эти особые аксоны не подвержены ингибирующему действию семафорина-3, тогда как другие нейроны подвержены (Messersmith et al., 1995). Наблюдения говорят о том, что семафорин-3 паттернирует сенсорные



Рис. 15.27. Отторжение конусов роста ганглиев дорсальных корешков. **А.** Двигательные аксоны мигрируют через ростральный (передний), но не через каудальный (задний) отдел каждого склеротома. **Б.** Эксперимент *in vitro*, в котором полоски с эфрином (+) помещали на подложку из ламинина. Двигательные аксоны росли только там, где эфрин отсутствовал (–). **В.** Ингибирование конуса роста эфрином после 10 мин инкубации. На левой фотографии показан контрольный аксон, обработанный сходным (но не ингибиторным) веществом; аксон на правом фото обработан эфрином, обнаруженным в задней части сомита

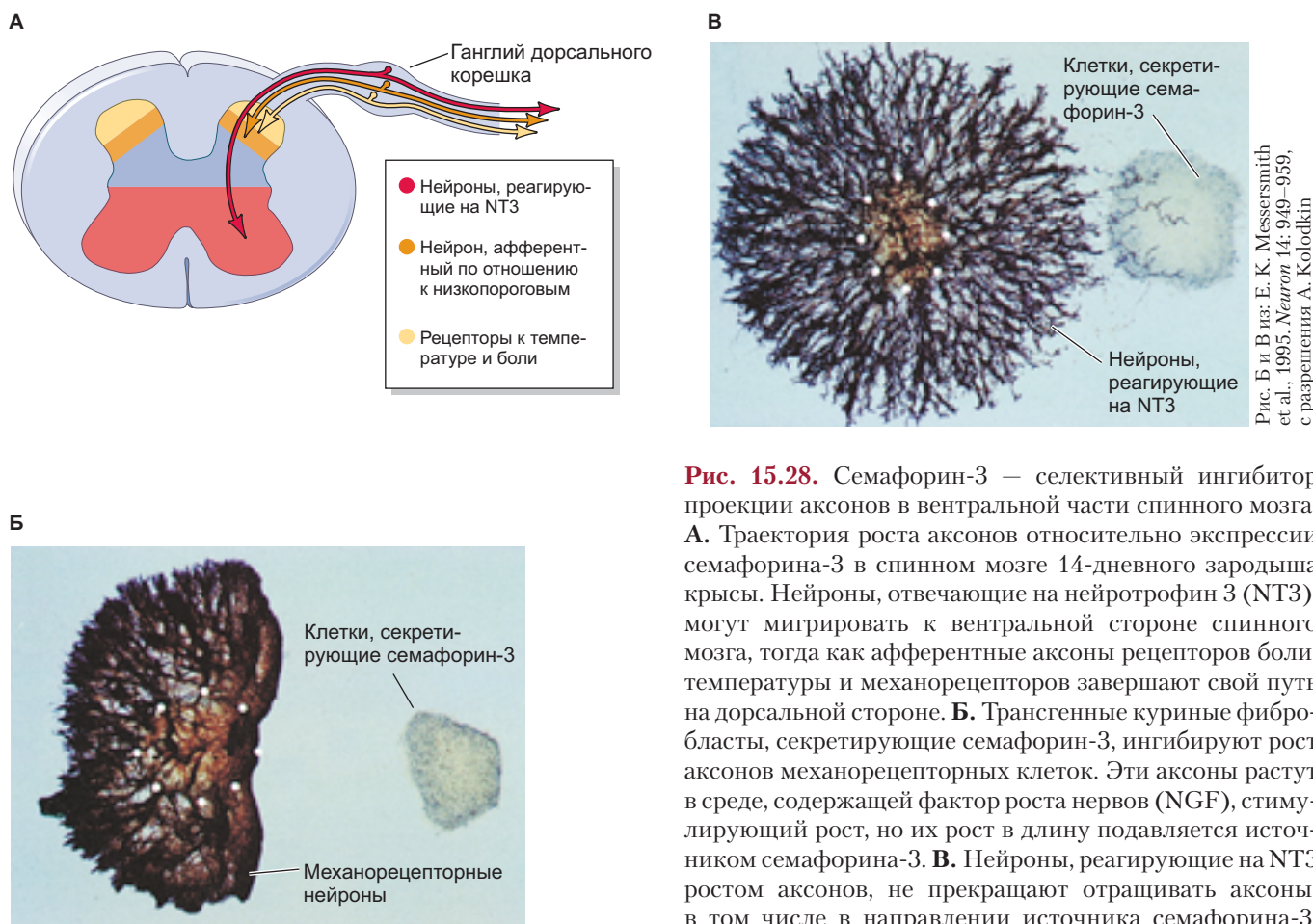


Рис. 15.28. Семафорин-3 — селективный ингибитор проекции аксонов в вентральной части спинного мозга. **А.** Траектория роста аксонов относительно экспрессии семафорина-3 в спинном мозге 14-дневного зародыша крысы. Нейроны, отвечающие на нейротрофин 3 (NT3), могут мигрировать к вентральной стороне спинного мозга, тогда как афферентные аксоны рецепторов боли, температуры и механорецепторов завершают свой путь на дорсальной стороне. **Б.** Трансгенные куриные фибробласты, секретирующие семафорин-3, ингибируют рост аксонов механорецепторных клеток. Эти аксоны растут в среде, содержащей фактор роста нервов (NGF), стимулирующий рост, но их рост в длину подавляется источником семафорина-3. **В.** Нейроны, реагирующие на NT3 ростом аксонов, не прекращают отращивать аксоны, в том числе в направлении источника семафорина-3, когда рост происходит в среде с NT3. (Рис. А по данным: Е. К. Messersmith et al., 1995. *Neuron* 14: 949–959; J. Marx, 1995. *Science* 268: 971–973.)

проекции от ганглиев дорсальных корешков путем селективного отталкивания определенных аксонов таким образом, что они останавливаются на дорсальной стороне. Схожая схема наблюдается в мозге, где семафорин, вырабатываемый в одной его области, предотвращает ее от вторжения нейронов, происходящих из другой области (Marín et al., 2001).

Как аксон пересекает дорогу?

Впервые мнение о том, что ориентирование аксонов в развивающейся нервной системе происходит с помощью хемотаксиса, высказал Сантьяго Рамон-и-Кахаль (1892). Он полагал, что комиссуральные нейроны спинного мозга посылают свои аксоны из дорсального положения в вентральное — к пластинке дна нервной трубки — под действием диффундирующих факторов. Комиссуральные нейроны (интернейроны) координируют двигательную активность правой и левой сторон тела. Чтобы выполнять эту функцию, они каким-то образом должны мигрировать к вентральной средней линии и пересекать ее. Аксоны комиссуральных нейронов начинают расти в стенке нервной трубки в вентральном направлении, однако, пройдя две трети пути, они изменяют направление и входят в область вентрально-латеральных (двигательных) нейронов, откуда направляются к клеткам пластинки дна (рис. 15.29).

По современным представлениям, существует две системы, участвующие в привлечении аксонов дорсальных комиссуральных нейронов к вентральной средней линии.

В первой участвует белок Sonic hedgehog (Shh), начинающий привлекать комиссуральные аксоны на вентральную сторону, что затем дополняется аттракцией нетрином, ведущей к пересечению вентральной средней линии. (Напомним в соответствии с гл. 13 важность Shh как морфогена для определения пути развития клеток; см. рис. 4.22 и 13.16). Shh производят и секретируют клетки дна нервной трубки, и он распространяется, создавая градиент с высокой концентрацией вентрально и низкой — дорсально. Блокирование сигнала Shh с помощью фармакологических ингибиторов или условного нокаута по Smothered приводило к уменьшению числа комиссуральных аксонов, достигающих вентральную среднюю линию (Charpon et al., 2003).

Любопытно, что управление комиссуральными аксонами через Shh происходит по *неканоническому* пути, через альтернативный рецептор Brother или Cdo (Voc) и независимо от Gli-опосредованной транскрипционной регуляции (см. рис. 4.22; Okada et al., 2006; Yam et al., 2009). Странно, что утрата рецепции белка Shh не приводит к полному исчезновению комиссуральных аксонов, пересекающих среднюю линию, т. е. в этот процесс может быть вовлечен какой-то другой фактор. Другим фактором оказался...

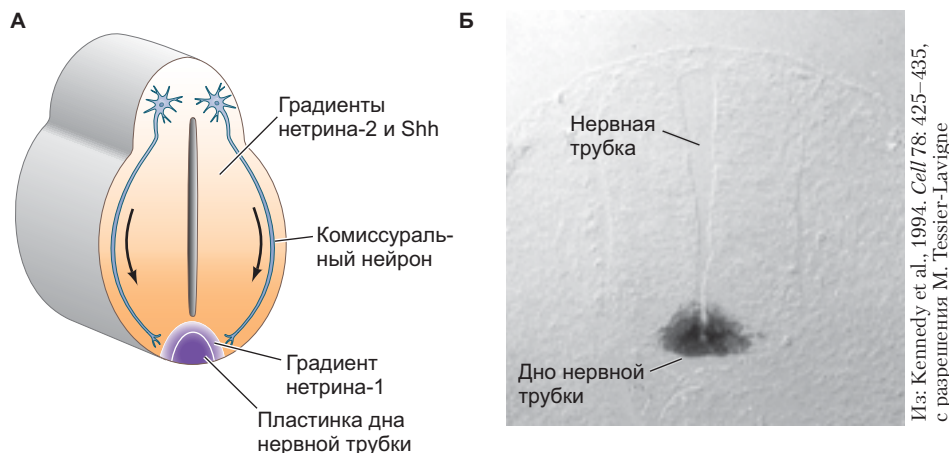


Рис. 15.29. Траектория комиссуральных аксонов в спинном мозге крысы. **А.** Схема модели, согласно которой комиссуральные нейроны сначала ориентируются по градиенту Sonic hedgehog и нетрина-2, а затем — по ступенчатому градиенту нетрина-1. Комиссуральные аксоны, ведомые хемотаксическими сигналами, растут в вентральном направлении по боковому краю, к пластинке дна. Достигнув ее, контактный сигнал от клеток пластинки дна заставляет аксоны сменить направление. **Б.** Авторадиографическое выявление мРНК *нетрина-1* в заднем мозге раннего зародыша крысы с помощью гибридизации *in situ* с антисмысловой РНК. Нейроны пластинки дна (бывшего дна нервной трубки) концентрируют в себе мРНК *нетрина-1* (темная область)

...Нетрин

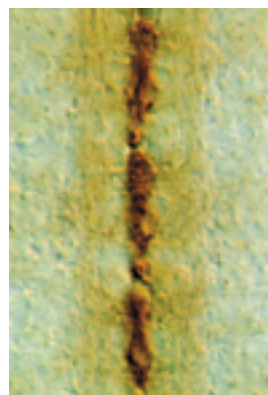
В 1994 г. Серафини с коллегами разработали методику, позволившую им осуществить скрининг диффундирующей молекулы, которая может управлять аксонами комиссуральных нейронов. Если дорсальные участки спинного мозга куриных зародышей культивировать на коллагеновом геле, поместив вблизи фрагмент дна нервной трубки, присутствие последних будет стимулировать отрастание комиссуральных аксонов от дорсального экспланта спинного мозга. Серафини и его сотрудники фракционировали гомогенат эмбрионального мозга курицы и затем тестировали разные фракции на их способность вызвать подобное действие. В результате были идентифицированы два белка — нетрин-1 и нетрин-2. Подобно Shh, нетрин-1 синтезируют и секретируют клетки дна нервной трубки, тогда как нетрин-2 образуется в вентральной области спинного мозга, но не в клетках пластинки дна (рис. 15.29Б). Согласно данной модели, конусы роста комиссуральных нейронов сначала сталкиваются с градиентами нетрина-2 и Shh, который приводит их в домен с более крутым градиентом нетрина-1. Нетрины распознают рецепторы DCC и DSCAM, экспрессирующимися в конусе роста комиссуральных аксонов (Liu et al., 2009).

Slit u Robo

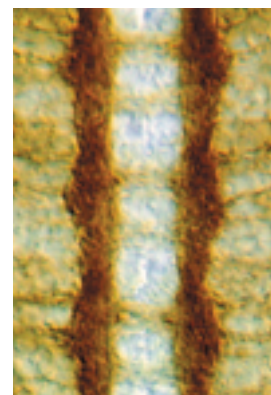
Похоже, что для того чтобы комиссуральный аксон пересек среднюю линию и продолжил расти в направлении от нее на противоположной стороне (противоположной по отношению к той стороне ЦНС, на которой осталось тело клетки), в качестве движущей силы нужны отталкивающие сигналы. Важной группой таких молекул являются белки Slit, экспрессируемые и секретируемые клетками средней линии (Neuhaus-Follini and Bashaw, 2015; Martinez and Tran, 2015). У *Drosophila* белок Slit секретируют глиальные клетки по средней линии нервной цепочки, где он предотвращает пересечение средней линии большинством аксонов. Белок Roundabout (Robo; выделяют Robo1¹, Robo2 и Robo3) представляет собой рецептор к Slit (Rothberg et al., 1990; Kidd et al., 1998; Kidd et al., 1999). Функция экспрессии рецепторов Robo в конусах роста нейронов, ищущих мишень, заключается в интерпретации сигналов Slit в качестве отталкивающих, что предотвращает пересечение средней линии и, в зависимости от репертуара экспрессируемых рецепторов Robo, определяет латеральное положение продольных пучков по отношению к средней линии (Rajagopalan et al., 2000;

Simpson et al., 2000; Bhat, 2005; Spitzweck et al., 2010). Утрата Slit или совместная утрата Robo1 и Robo2 приводит к преждевременному пересечению аксонами средней линии и их консолидированному росту в продольном направлении вдоль средней линии (рис. 15.30). Эти и другие результаты легли в основу модели, согласно которой аксоны комиссуральных нейронов, пересекающие среднюю линию, временно уходят от отторгающего эффекта путем снижения уровня экспрессии белков Robo1/2 на подходе к средней линии. Как только конус роста пересекает среднюю линию, нейроны снова начинают экспрессировать белки Robo в конусе роста и снова становятся чувствительными к отторгающему действию Slit на средней линии (рис. 15.31; Brose et al., 1999; Kidd et al., 1999; Orgogozo et al., 2004).

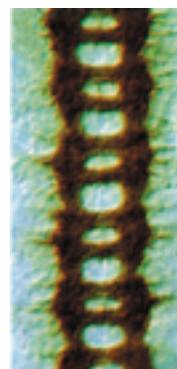
А Slit-белок



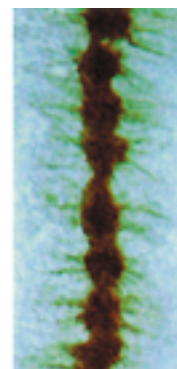
Б Robo-белок



В Дикий тип



Г Slit^{-/-}



Все рисунки из: Т. Kidd et al., 1999. *Cell* 96: 785–794, с разрешения С. S. Goodman

Рис. 15.30. Регуляция пересечения средней линии аксонами за счет белков Robo/Slit. Robo и Slit в центральной нервной системе *Drosophila*. **А.** Выявление средней линии с помощью обработки антителами белка Slit в глиальных клетках. **Б.** Белок Robo синтезируют нейроны, чьи аксоны составляют продольные тракты ЦНС. **В.** В ЦНС дикого типа пучки аксонов, пересекающих среднюю линию, формируют паттерн, подобный лестнице. **Г.** Окрашивание ЦНС с помощью антител ко всем нейронам у доминантного негативного мутанта по *Slit* показывает аксоны, входящие в среднюю линию, но не выходящие из нее (вместо аксонов, идущих вдоль нее)

¹ Как видно по всей биологии развития, определение термина «мишень» весьма проблематично. В данном контексте мишень не просто пассивный объект, но объект с необходимой активностью.

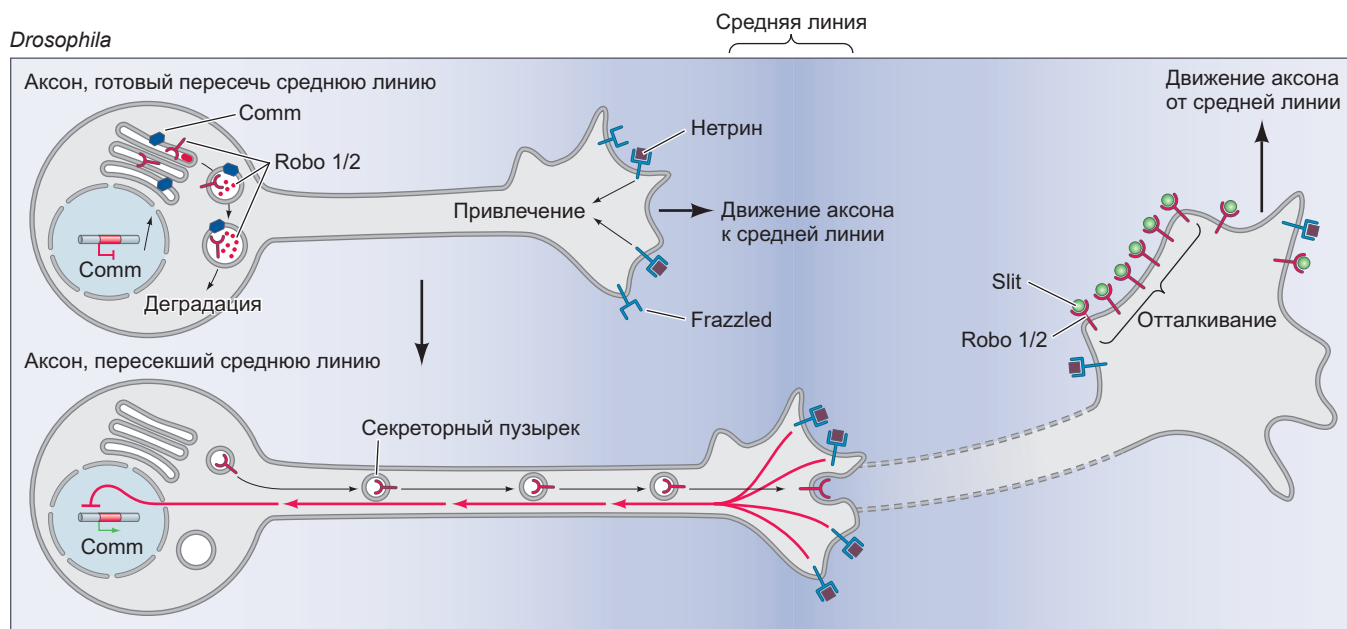


Рис. 15.31. Модель направленного роста аксона комиссурального нейрона, пересекающего среднюю линию, у мыши и *Drosophila*. Показан отдельный комиссуральный нейрон, находящийся в левой половине вентральной нервной цепочки *Drosophila* (сверху) или нервной трубки мыши (снизу). Сигнальный путь, опосредованный Slit-Robo, обеспечивает отталкивание растущего аксона. У *Drosophila* аксоны перед пересечением средней линии должны получить отталкивающий сигнал Slit, и рецепторы Robo перенаправляются за счет белка Comm в лизосомы для деградации. Однако на средней линии увеличение активности сигнального пути через рецептор нетрина Frazzled запускает снижение активности Comm. Из-за этого Robo возвращается в конус роста, и благодаря Slit-опосредованному отторжению аксон не пересекает среднюю линию в обратном направлении. У мыши нетрин и Shh привлекают к средней линии комиссуральные аксоны, готовые ее пересечь, через рецепторные комплексы Frazzled/DCC и Ptc-Boc-Smo соответственно. В аксонах, пересекших среднюю линию, повышается экспрессия белка 14-3-3, что меняет ответ клетки на Shh из-за изменения активности PKA, находящейся под влиянием сигнального пути Shh. У позвоночных рецепторы Robo1/2 (R1/2) способны подавлять связывание нетрина с DCC; в аксонах, стремящихся пересечь среднюю линию, это подавление, а также отталкивание аксона за счет Slit-Robo, должны быть ослаблены (продолжение рисунка на с. 483)

Путешествие аксонов ганглиозных клеток сетчатки

Почти все механизмы спецификации нейронов и определения специфичности аксонов, упомянутые в данной главе, можно наблюдать на нейронах сетчатки, посылающих свои аксоны в области обработки зрительной информации в мозге. Несмотря на некоторые различия, развитие сетчатки и поиск мишени аксоном во многом схожи у разных позвоночных. Например, в случае с двигательными нейронами семейство транскрипционных факторов LIM (в частности Islet-2) дифференциально экспрессируется в ганглиозном слое развивающейся сетчатки, определяя путь клеток, что в конечном счете определяет репертуар рецепторов на конусе роста, ведущих аксон к структурам тектума (Bejarano-Escobar et al., 2015). Когда вы читаете о механизмах, соединяющих сетчатку с мозгом, попробуйте увидеть параллели

с уже знакомыми стратегиями развития, которые теперь видятся в новом контексте.

Рост аксонов ганглиозных клеток к зрительному нерву

Первые этапы процесса, в ходе которого аксоны ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) достигают определенных зон в зрительной части крыши среднего мозга (тектума), происходят в сетчатке, или точнее — в нервной сетчатке зрительного бокала. По мере дифференцировки ГКС их положение на внутреннем крае сетчатки определяют молекулы кадгеринов (N-кадгеринов и специфичных для сетчатки R-кадгеринов) на их мембранах (Matsunaga et al., 1988; van Horck et al., 2004). Аксоны ГКС растут по внутренней поверхности сетчатки к зрительному диску (головке зрительного нерва). Зрелый зрительный нерв человека содержит более миллиона аксонов ГКС.

Мышь

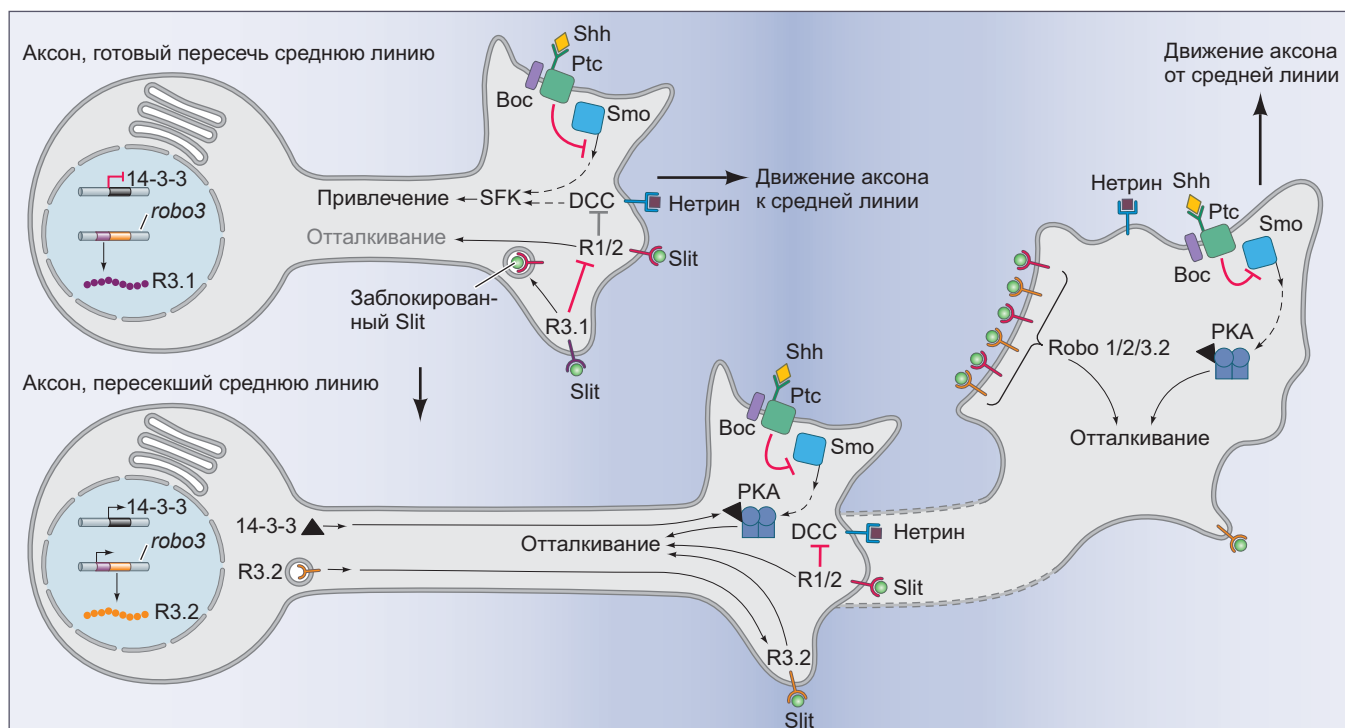


Рис. 15.31 (продолжение). Изоформа Robo3.1 (R3.1) *может* работать как ингибитор Robo1/2, что позволяет привлечение, опосредованное нетрином. Более того, Robo3.1 может конкурентно подавлять Slit без прямых последствий для направленной миграции аксона, что ограничивает количество свободного Slit для связывания с Robo1/2. Однако в аксонах, пересекших среднюю линию, повышена экспрессия изоформы Robo3.2 (R3.2), а изоформа 3.1 исчезает. Похоже, что изоформа Robo3.2 по функции схожа с каноническим репеллентом Slit

Рост аксонов ганглиозных клеток сетчатки сквозь зрительную хиазму

У позвоночных, за исключением млекопитающих, пунктом назначения для аксонов ГКС является часть мозга, называемая зрительным тектумом, тогда как у млекопитающих аксоны стремятся к боковому коллатеральному ядру. Судя по многим фактам, путешествие аксонов ГКС внутри мозга происходит по субстрату из астроглии (Bovolenta et al., 1987; Marcus and Easter, 1995; Barresi et al., 2005). Ламинин, как оказалось, позволяет аксонам пересекать зрительный перекрест. У позвоночных, за исключением млекопитающих, аксоны ГКС пересекают среднюю линию (хиазму) и двигаются по зрительному тракту в тектум, следуя по поверхности глиальных клеток, покрытых ламинином. Очень немногие области головного мозга содержат ламинин, и на этом тракте ламинин экспрессируется только в то время, когда по нему растут волокна зрительного нерва (Cohen et al., 1987). То есть глиальные клетки создают временную дорожку, покрытую ламинином, по которой аксоны ГКС предпочтительно растут от глаза к тектуму. Однако сам факт наличия пути, пригодного для движения, еще не означает, что вы на самом деле знаете, в каком направлении двигаться. Каким

образом конусы роста ГКС выбирают направление вдоль средней линии и затем движутся к тектуму или боковому коллатеральному телу?

Аксоны ГКС следуют из глаза и составляют зрительный нерв за счет экспрессии нетрина и держатся этого пути вместе из-за отталкивания их окружения, опосредованного семафоридами (Harada et al., 2007). Достигая средней линии, аксоны ГКС «принимают решение», следовать им дальше через среднюю линию и формировать зрительную хиазму или повернуть на 90° и остаться на той же стороне мозга. Область зрительной хиазмы у млекопитающих и рыб выглядит как коридор (перпендикулярный средней линии), в котором экспрессируется Slit и по которому следуют аксоны ГКС. Отталкивание, вызываемое Slit, предотвращает неуместное распространение аксонов вне хиазмы. Таким образом, хотя зрительный перекрест находится на средней линии, тут используется совершенно иная стратегия Slit-опосредованного отталкивания, нежели в средней линии на вентральной стороне спинного мозга (рис. 15.31). Как и в сетчатке, Robo2 оказался главным посредником управления аксонами ГКС в вентральной части переднего мозга, где формируется зрительный перекрест (рис. 15.32; Erskine et al., 2000; Hutson and Chien, 2002; Plump et al., 2002; Barresi et al., 2005).

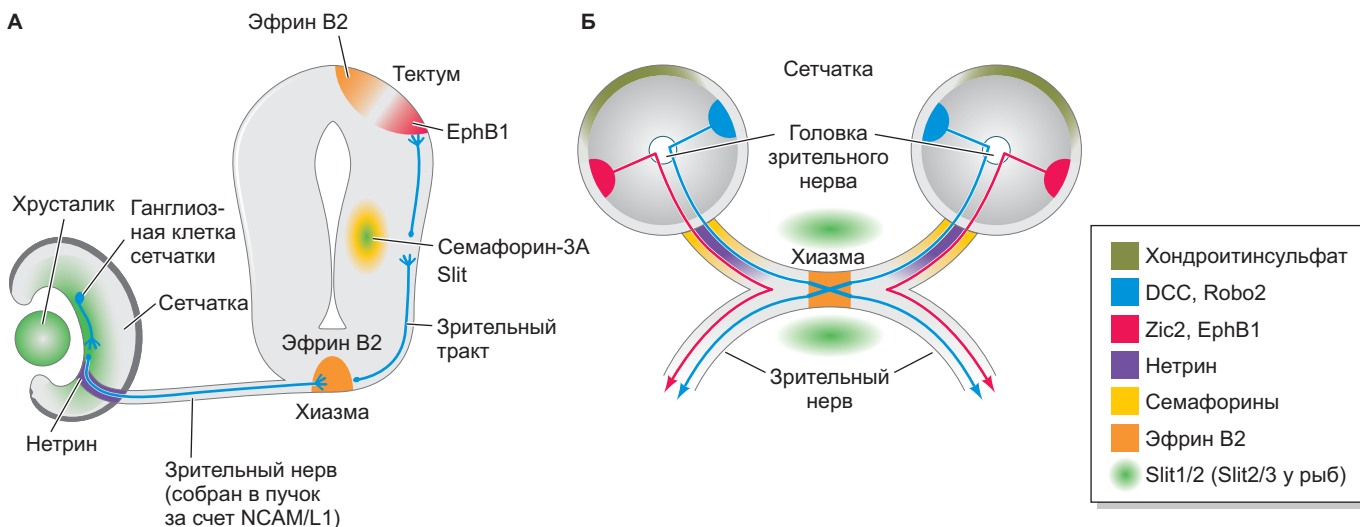


Рис. 15.32. Миграцией аксонов ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) в зрительный тектум управляют множественные сигналы. Управляющие молекулы, относящиеся к семействам нетринов, Slit, семафоринов и эфринов, экспрессируются в ограниченных областях, в нескольких точках на пути направленного роста аксонов ГКС. Аксоны ГКС отталкиваются от периферии сетчатки, возможно, за счет хондроитинсульфата. В месте, называемом головкой зрительного нерва, аксоны выходят из сетчатки и входят в зрительный нерв, ведомые нетрин/DCC-опосредованным привлечением. Оказавшись в составе зрительного нерва, аксоны остаются вместе за счет ингибиторных взаимодействий. Белки Slit в области зрительного перекреста (хиазмы) создают зону ингибирования. Ганглии в вентрально-латеральной области сетчатки, экспрессирующие Zic2, проецируют EphB1-экспрессирующие аксоны, которые отторгает эфрин В2 из хиазмы, и заканчивают свой путь миграции на ипсилатеральных мишенях (т. е. в том же полушарии мозга). Нейроны из средней области сетчатки не экспрессируют EphB1, и их аксоны мигрируют в противоположное (контралатеральное) полушарие. **А.** Поперечный срез. **Б.** Вид с дорсальной стороны. Показаны не все сигналы. (Рис. А по данным: F. P. van Horck et al., 2004. *Curr Opin Neurobiol* 14: 61–66; рис. Б по данным: T. C. Narada et al., 2007. *Genes Dev* 21: 367–378.)

У лягушек и рыб все аксоны ГКС пересекают зрительный перекрест и оказываются на противоположной (контралатеральной) стороне, тогда как у млекопитающих часть аксонов ГКС остается на той же (ипсилатеральной) стороне. Оказалось, что эти аксоны, не переходящие на другую сторону мозга, отталкиваются от переходящих на другую сторону аксонов в момент прохождения зрительной хиазмы (Godement et al., 1990). Отталкиванием управляет синтез эфрина и Shh в клетках, занимающих хиазмы. Сигналы с уровня средней линии воспринимаются рецепторами Eph и Wnt, эксклюзивно экспрессируемыми на ипсилатеральных проекциях ГКС (Cheng et al., 1995; Marcus et al., 2000; Fabre et al., 2010).



Загадки развития

Аксоны ГКС в течение большей части своего путешествия контактируют с астроглией. Какова значимость этих нейрон-глиальных взаимодействий и какие специфичные молекулы важны для их обеспечения?

Выбор мишени: «Мы уже на месте?»

В некоторых случаях нервы одного ганглия могут иметь несколько разных мишеней¹. Откуда нейрон узнает, с какой клеткой формировать синапс? Основные механизмы специфичности лиганд-рецепторных взаимодействий, приводящие конус роста к своей мишени, могут также играть роль в уточнении пункта назначения. Что представляют собой сигналы, направляющие нейрон по правильному адресу?

¹ Существует некоторая путаница между терминами *нейротропный* и *нейротрофический*. Нейротропный (от лат. *tropicus* — поворачивающий движение) подразумевает, что что-то привлекает нейрон. Нейротрофический (от греч. *trophikos* — питающий или питательный) относится к способности факторов поддерживать нейрон живым, обычно применительно к ростовым факторам. Поскольку многие агенты обладают и тем и другим свойствами, то в качестве альтернативы их называют *нейротропинами* и *нейротрофинами*. В современной литературе термин *нейротрофин* используется более широко.

Хемотактические белки

ЭНДОТЕЛИНЫ

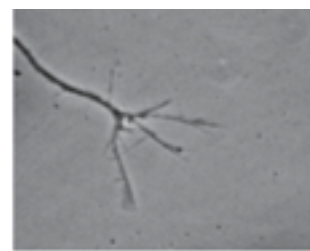
Аксоны некоторых нейронов верхнего шейного ганглия (самого крупного ганглия шеи) идут к каротидной артерии, а аксоны других нейронов того же ганглия не идут. Оказалось, что аксоны, следующие из верхнего шейного ганглия к каротидной артерии, движутся за кровеносными сосудами, которые тоже тут залегают. Кровеносные сосуды секретируют небольшие пептиды **эндотелины**. В добавок к их роли во взрослом организме, заключающейся в сокращении кровеносных сосудов, эндотелины в развитии направляют миграцию определенных клеток нервного гребня (например, тех, что входят в кишку) и некоторых симпатических аксонов, имеющих рецепторы к эндотелинам на их мембране (Makita et al., 2008).

НЕЙРОТРОФИНЫ

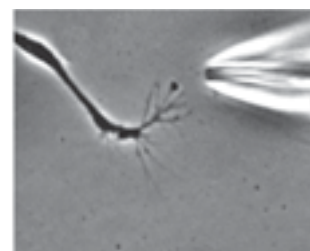
Некоторые клетки-мишени продуцируют набор хемотактических белков, вместе называемых нейротрофинами. Нейротрофины включают фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор мозга (BDNF), консервативный дофаминовый нейротрофический фактор (CDNF) и нейротрофины 3 и 4/5 (NT3, NT4/5). Эти белки секретируются потенциальными тканями-мишенями и работают на короткой дистанции, как хемотактические (привлекающие) или хеморепульсивные (отталкивающие) факторы (Paves and Saarma, 1997). Каждый из них может одновременно привлекать одни аксоны к своему источнику и стимулировать их рост и ингибировать другие. Например, сенсорные нейроны ганглиев дорсальных корешков у крысы стремятся к источнику NT3 (рис. 15.33), но ингибируются фактором BDNF.

ХЕМОТРОФИНЫ: КАЧЕСТВО И КОЛИЧЕСТВО

Прикрепление аксона к его мишени может происходить «аналоговым» или «цифровым» образом. В «аналоговом» режиме разные аксоны распознают одни и те же молекулы на поверхности мишени, но решающую роль в формировании контакта играет число молекул; такую ситуацию можно наблюдать при прикреплении нейронов сетчатки в тектуме у рыб (Gosse et al., 2008). В другом случае работает чрезвычайно качественное на молекулярном уровне («цифровое») связывание, специфичное для конкретных нейронов. Данные процессы происходят с нейронами сетчатки у *Drosophila*. У белка Dscam несколько тысяч сплайс-изоформ (см. гл. 3), и эта вариабельность может обеспечивать высокую специфичность распознавания данных нейронов нейронами-мишенями (Millard et al., 2010; Zipursky and



0



10 мин

Из: H. Paves and M. Saarma, 1997. *Cell Tissue Res* 290: 285–297, с разрешения M. Saarma

Рис. 15.33. Аксон зародыша из ганглия дорсального корешка крысы поворачивается вслед за источником NT3. На фотографиях запечатлен конус роста с 10-минутным интервалом. У этого же конуса роста показано отсутствие чувствительности к другим нейротрофинам

Sanes, 2010). Учитывая сложность межнейронных взаимодействий, нельзя исключать, что задействованы как качественный, так и количественный механизмы (Winberg et al., 1998).

Выбор мишени аксонами сетчатки: видеть — значит верить

Когда аксоны клеток сетчатки доходят до конца оптического тракта, выстланного ламином, они распластываются и ищут специфичную мишень в зрительном тектуме. Исследования на лягушках и рыбах (у которых нейроны сетчатки каждого глаза проецируются в противоположное полушарие мозга) показали, что каждый ганглиозный аксон сетчатки посылает импульс к определенному месту (клетке или небольшой группе клеток) в зрительном тектуме (рис. 15.34А; Sperry, 1951). В мозге лягушки существует два зрительных тектума. Аксоны из правого глаза формируют синапсы в левом зрительном тектуме, а аксоны левого глаза — в правом.

Карта связей между сетчаткой и зрительным тектумом у лягушки (**карта ретино-тектальных проекций**) была детально описана Маркусом Якобсоном (1967). Он построил карту, освещая узким пучком света небольшую ограниченную область сетчатки и регистрируя, с помощью электрода в тектуме, какие клетки тектума при этом стимулируются. Ретино-тектальные проекции *Xenopus laevis* показаны на рис. 15.34Б. Свет, падающий на вентральную часть сетчатки, стимулировал клетки на боковой поверхности

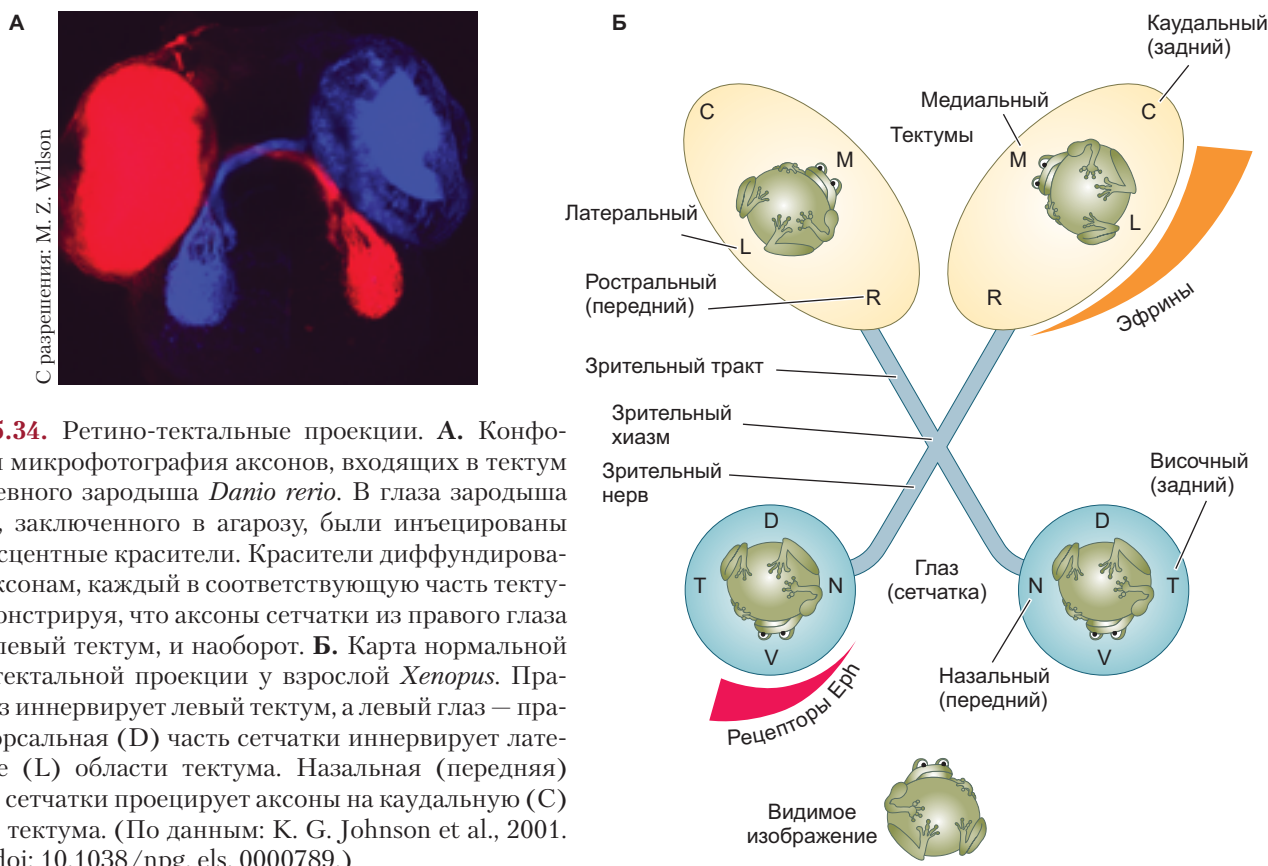


Рис. 15.34. Ретино-тектальные проекции. **А.** Конфокальная микрофотография аксонов, входящих в тектум пятидневного зародыша *Danio rerio*. В глаза зародыша *D. rerio*, заключенного в агарозу, были инъецированы флуоресцентные красители. Красители диффундировали по аксонам, каждый в соответствующую часть тектума, демонстрируя, что аксоны сетчатки из правого глаза идут в левый тектум, и наоборот. **Б.** Карта нормальной ретинотектальной проекции у взрослой *Xenopus*. Правый глаз иннервирует левый тектум, а левый глаз — правый. Дорсальная (D) часть сетчатки иннервирует латеральные (L) области тектума. Назальная (передняя) область сетчатки проецирует аксоны на каудальную (C) область тектума. (По данным: K. G. Johnson et al., 2001. In *eLS*. doi: 10.1038/npg.els.0000789.)

сти тектума. Схожим образом свет, сфокусированный на височной (задней) части сетчатки, стимулировал клетки в каудальной части тектума. Эти исследования, точка за точкой, показали соответствие между клетками сетчатки и клетками тектума. Когда активировалась группа клеток сетчатки, стимуляции подвергалась очень небольшая и специфичная группа клеток тектума. Более того, эти группы клеток образуют континуум; другими словами, соседствующие координаты на сетчатке проецируются на такие же соседствующие точки в тектуме. Такое устройство позволяет лягушке видеть цельную нераздробленную картинку. Эта удивительная специфичность привела Сперри (1965) к **гипотезе хемоафферинности**:

Сложные цепи нервных волокон мозга растут, строятся и организуют сами себя благодаря использованию запутанных химических кодов под генетическим контролем. В раннем развитии нервные клетки, исчисляемые миллионами, приобретают и сохраняют впоследствии индивидуальные идентификационные метки химической природы, с помощью которых они могут различаться и распознаваться.

В соответствии с современными представлениями нет необходимости в точной специфичности между каждым аксоном и нервом, с которым он устанавливает контакт. Уже показано, что градиенты адгезивных свойств (особенно это касается взаимодействий на основе отторжения) определяют территории, куда

входит аксон, и конкуренция между нейронами, зависящая от их активности, определяет окончательные связи каждого аксона.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Специфичность адгезии в разных областях зрительного тектума: эфрины и Epr

Доказано, что ганглиозные клетки сетчатки различают разные области зрительного тектума. Клетки вентральной половины нервной сетчатки курицы предпочтительно формируют контакты с дорсальной (медиальной) половиной тектума, и наоборот (Gottlieb et al., 1976; Roth and Marchase, 1976; Halfter et al., 1981). Статус ганглиозных клеток сетчатки определен благодаря дорсально-вентральному градиенту транскрипционных факторов. Для дорсальных ГКС характерен высокий уровень экспрессии Tbx5, а для вентральных клеток — высокий уровень Pax2 (Koshiba-Takeuchi et al., 2000). Таким образом, ГКС специфицируются в соответствии с их положением.

Один из градиентов, который удалось идентифицировать по его функции, — это градиент отторжения, наивысший в заднем тектуме и самый низкий в его передней области. Бонхёффер

и коллеги приготовили «коврик», составленный из чередующихся полосок мембран либо задней, либо передней области тектума. С помощью «коврика» было показано, что ганглиозные клетки носовой части сетчатки проецировали свои аксоны с одинаковым успехом как на передние, так и на задние тектальные мембраны. Однако нейроны височной стороны сетчатки посылали аксоны только на передние тектальные мембраны (Walter et al., 1987; Baier and Bonhoeffer, 1992). Если конус роста ганглиозного аксона височной сетчатки приходил в контакт с клеточными мембранами задней части тектума, его филоподии сокращались, а конус роста коллапсировал и отступал (Cox et al., 1990).

В основе такой осевой специфичности, проявляемой клетками сетчатки в пространственном распознавании доменов тектума, лежат два набора градиентов в тектуме и сетчатке. Первый набор градиентов состоит из эфринов и их рецепторов. В зрительном тектуме обнаружены эфриновые белки (особенно эфрины A2 и A5) в виде градиентов, с наивысшей концентрацией в задней (каудальной)

части тектума и снижающейся к передней (в ретро-стральном направлении) (**рис. 15.35А**). Более того, клонированные эфриновые белки обладают способностью отторгать аксоны, а эктопически экспрессированный эфрин препятствует росту аксонов из височной (но не из носовой) области сетчатки к месту своей экспрессии (Drescher et al., 1995; Nakamoto et al., 1996). Комплементарные рецепторы Eph были обнаружены на ганглиозных клетках сетчатки куриного зародыша, экспрессированные в виде височно-носового градиента вдоль ганглиозных аксонов сетчатки (см. рис. 15.35А; Cheng et al., 1995).

Эфрины оказались чрезвычайно гибкими молекулами. Разница в концентрациях эфрина А в тектуме может лежать в основе топографической карты (на которой положение нейронов в сетчатке прямо проецируется на мишени). Ганзен с коллегами (2004) показали, что эфрин А может быть как аттрактивным, так и отторгающим сигналом для аксонов сетчатки. Более того, количественные оценки этой молекулы при росте аксонов показали, что происхождение аксона определяет, будет он

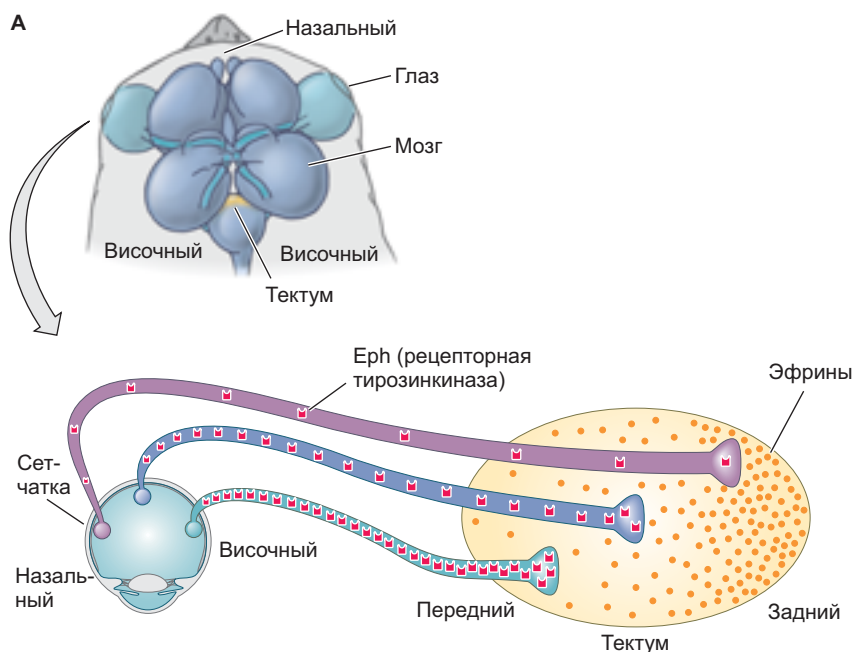
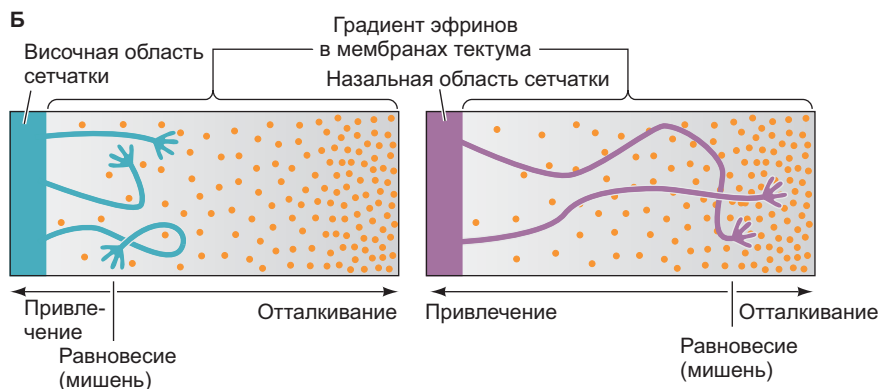


Рис. 15.35. Дифференциальная ретино-тектальная адгезия, управляемая градиентами рецепторов Eph и их лигандов. **А.** Схема двойных градиентов Eph-рецепторной тирозинкиназы в сетчатке и ее лигандов (эфринов A2 и A5) в тектуме. **Б.** Эксперимент, демонстрирующий, что аксоны ганглиозных клеток сетчатки из височной (не из назальной) области реагируют на градиент эфрина в мембранах тектума путем изменения направления роста или его замедления. Равновесие между привлекающими и отталкивающими силами, свойственное градиенту, может в итоге приводить специфичные аксоны к их мишеням. (По данным: M. Barinaga, 1995. *Science* 269: 1668–1670; M. J. Hansen et al., 2004. *Neuron* 42: 717–730.)



привлекаться или отторгаться эфринами. Рост аксона стимулируют низкие концентрации эфрина А впереди от мишени этого аксона и ингибируют высокие концентрации позади мишени (рис. 15.35Б). Благодаря этому каждый аксон попадает в нужное место и узнает, что дальше мигрировать не нужно. В точке равновесия не должно быть ни роста, ни ингибирования, и в этом месте могут формироваться синапсы с тектальными нейронами-мишенями.

Для дальнейшего уточнения образовавшейся ретино-тектальной карты имеется второй набор градиентов, параллельный эфринам и Eph. В тектуме присутствует градиент Wnt3 с наибольшим уровнем в средней области и наименьшим по краям (как в градиенте эфрина). В сетчатке имеется градиент рецепторов к Wnt с наибольшим уровнем на вентральном крае (как для белков Eph). Оба этих набора градиентов необходимы для задания координат аксонов и их мишеней (Schmitt et al., 2006).

Формирование синапса

После контакта аксона с мишенью (обычно это мышца или другой нейрон) он формирует специализированное соединение, называемое **синапсом**.

На конце аксона пресинаптического нейрона (т. е. нейрона, передающего сигнал) высвобождаются нейромедиаторы, деполяризующие или гиперполяризующие мембрану клетки-мишени (**постсинаптическую клетку**). Нейромедиаторы высвобождаются в синаптическую щель между двумя клетками, где они связываются с рецепторами на поверхности клетки-мишени.

Формирование синапса происходит в несколько этапов (Burden, 1998). В случае двигательных нейронов спинного мозга, направляющих свои аксоны к мышцам, конусы роста, которые контактируют с новообразованными мышечными клетками, мигрируют по их поверхностям. Сразу после прикрепления конуса роста к мембране мышечной клетки какие-либо признаки специализации контактирующих мембран не видны. Однако вскоре в окончаниях аксонов начинают накапливаться пузырьки, содержащие нейромедиатор, и мембраны обеих клеток в области контакта утолщаются, а синаптическую щель между клетками заполняет межклеточный матрикс, в состав которого входит особая форма ламинина (**рис. 15.36А–В**). Ламинин, выделяемый мышцей, специфично связывается с конусами роста двигательных нейронов и может выполнять функцию «стоп-сигнала» для роста аксона (Martin et al., 1995; Noakes et al., 1995). По крайней мере некоторые синапсы между нейронами стабилизирует N-кадгерин. Активность синапса приводит к высвобождению N-кадгерина из запасных пузырьков в конусе роста (Tanaka et al., 2000).

В мышцах, после того как первый аксон сформирует контакт, на том же месте собираются конусы роста других аксонов и формируют дополнительные синапсы. В ходе развития всех изученных мышц млекопитающих наблюдали их иннервацию по меньшей мере двумя аксонами. Однако такая *полинейронная иннервация* оказывается временной.

Во время раннего постнатального периода происходит ретракция всех аксонов, за исключением одного (рис. 15.36Г–Е). В основе этой «адресной селекции» лежит конкуренция между аксонами (Purves and Lichtman, 1980; Thompson, 1983; Colman et al., 1997). Активность одного двигательного нейрона подавляет синапсы других нейронов, возможно, это происходит с участием оксида азота (Dan and Poo, 1992; Wang et al., 1995). В конце концов менее активные синапсы элиминируются. Концевая часть сохранившегося аксона расширяется и одевается Шванновской клеткой (см. рис. 15.36Д).



Загадки развития

В течение нашей жизни в мозге имеет место значительная синаптическая пластичность и проблемы с формированием новых синапсов могут лежать в основе многих заболеваний, таких как расстройства аутистического спектра. Какую роль играют в перестройке синапсов в постнатальный период жизни механизмы направленного поиска и определения мишени аксоном?

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Выживание нейронов в зависимости от активности

Гибель нейронов путем апоптоза вызывают отнюдь не какие-либо видимые их дефекты. На самом деле до гибели нейроны дифференцируются и успешно отрачивают аксоны к своим мишеням. Оказалось, что ткань-мишень регулирует число аксонов, иннервирующих ее, избирательно поддерживая выживание определенных нейронов, сформировавших синапсы. Последние исследования иннервации конечности моторными нейронами показали, как выживание нейронов зависит от их активности (Hua et al., 2013). Если вследствие нарушений в системе определения цели аксон иннервирует неправильную мышечную клетку в конечности, он все равно выживает, несмотря на ошибку в выборе цели, так как синапс формируется успешно. И наоборот, если двигательный нейрон не способен найти свою мышечную клетку-мишень в конечности мыши, нокаутированной по Frizzled-3 (рецептор Wnt/PCP), он никогда не сформирует синапс и поэтому подвергается апоптозу (**рис. 15.37**; Hua et al., 2013).

Эти результаты однозначно показывают, что выживание нейронов зависит от успешного формирования синапсов и от клетки-мишени (мышечной

в данном случае), посылающей сигнал пресинаптической клетке, обеспечивающий ее выживание. *Что это за сигнал?*

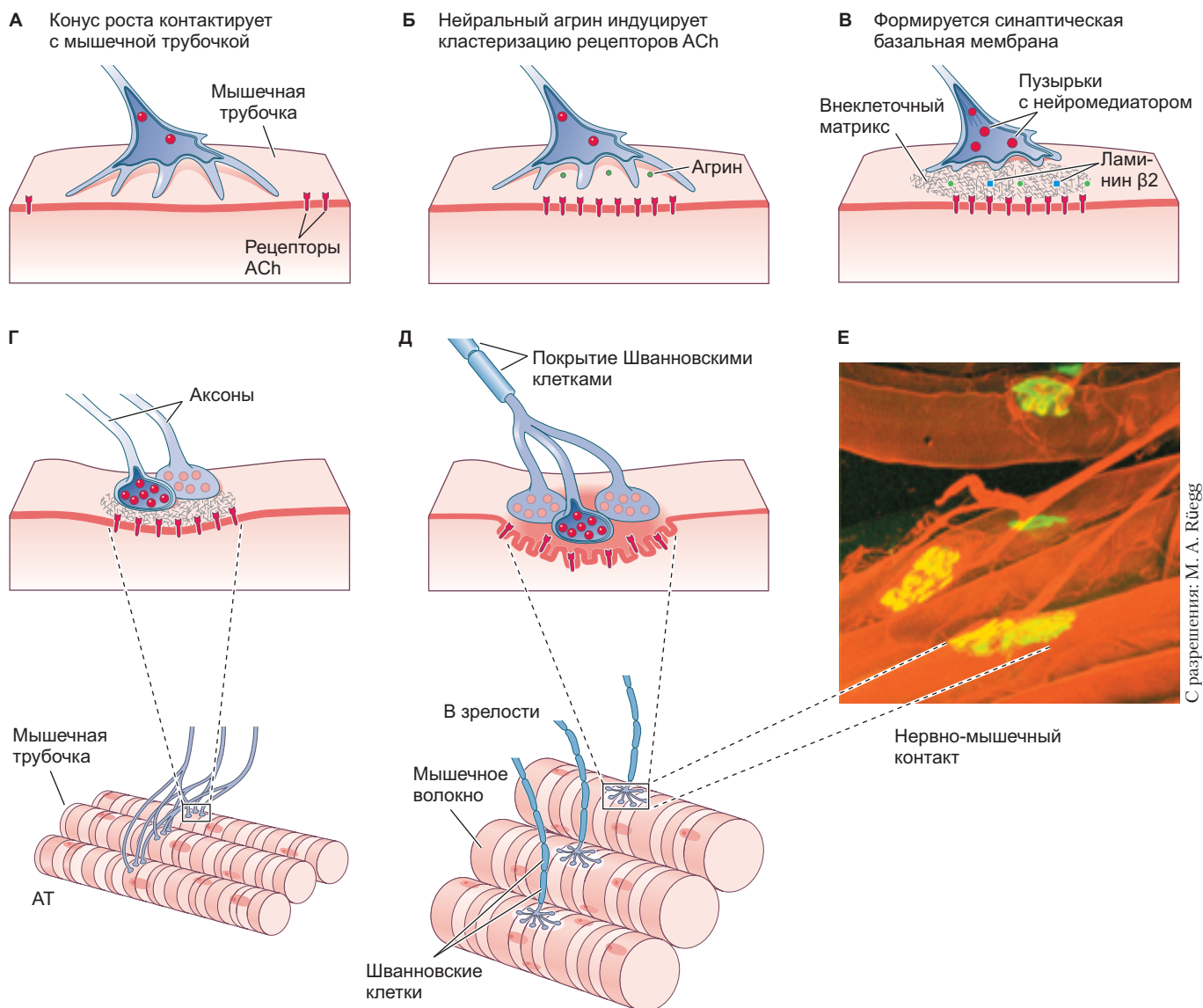


Рис. 15.36. Дифференцировка синапса между двигательным нейроном и мышцей у позвоночного. **А.** Конус роста сближается с развивающейся мышечной клеткой. **Б.** Аксон останавливается и формирует неспециализированный контакт на поверхности мышцы. Секретируемый аксоном, вызывает кластеризацию ацетилхолиновых (ACh) рецепторов около аксона. **В.** Пузырьки с нейромедиатором входят в концевой отдел аксона (АТ), а внеклеточный матрикс образует синаптическое расширение в месте контакта конца аксона с мышечной клеткой. Этот матрикс содержит нейронспецифичный ламинин. **Г.** Другой аксон стыкуется с этим же местом формирования синапса. Ниже показано, как отдельные мышечные клетки иннервируются сразу несколькими аксонами (можно наблюдать у новорожденных млекопитающих). **Д.** Все аксоны, кроме одного, элиминируются. Оставшийся аксон может ветвиться с формированием сложного нервно-мышечного контакта с мышечным волокном. Каждый конец аксона (терминаль) покрыт отростком шванновской клетки и складками мембраны мышечной клетки. На общей схеме показана иннервация мышцы через несколько недель после рождения. **Е.** Общий вид зрелого нервно-мышечного контакта у мыши. (Рис. А–Д по данным: Z. W. Hall, 1995. *Science* 269: 362–363; Z. W. Hall and J. R. Sanes, 1993. *Cell* 72: 99–121; D. Purves, 1994. *Neural Activity and the Growth of the Brain*. Cambridge University Press: New York.)

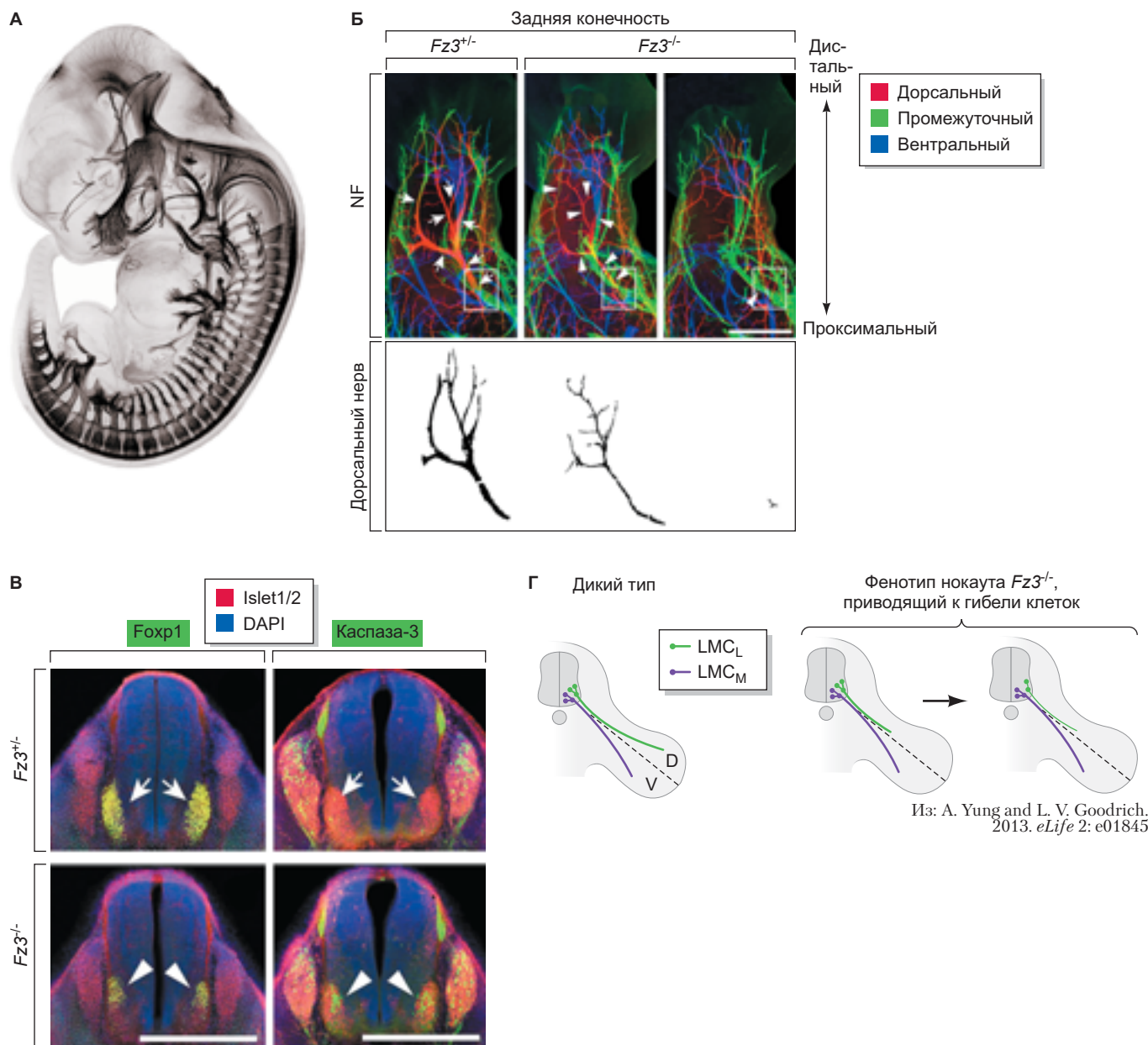
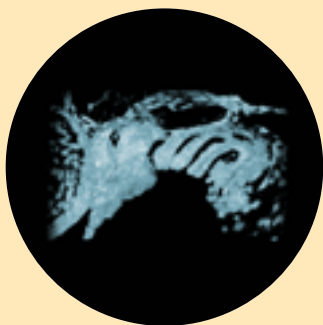


Рис. А–В из: Z. L. Hua et al., 2013. *eLife* 2: e01482/CC BY 3.0

Рис. 15.37. Анализ остановки миграции и гибели аксонов двигательных нейронов у мышей, нокаутированных по *Frizzled-3*. **А.** Иммуноцитохимический анализ на целом зародыше с антителами к нейрофиламентам, метящими все аксоны зародыша. **Б.** Увеличенная область аксонных проекций в задней конечности, визуализированная с помощью антител к нейрофиламентам (NF); аксоны данной конечности окрашены в разные псевдоцвета в зависимости от положения вдоль дорсально-вентральной оси. Гетерозиготные по *Fz3* мыши демонстрируют нормальные проекции дорсальных нейронов, тогда как гомозиготные по *Fz3* мутанты утрачивают дорсальные нервы в разной степени (два примера из их числа представлены здесь). Траектории аксонов двигательных нейронов LMC_L (дорсальный нерв) показаны отдельно под каждой фотографией, чтобы отметить сокращение проекций аксонов дистально по отношению к сплетению. **В.** Поперечный срез спинного мозга с окрашенными популяциями двигательных нейронов, а также клетками в состоянии апоптоза (по активности каспазы-3; показано зеленым на правом фото). Мыши, нокаутированные по *Frizzled-3* (нижнее фото), демонстрируют снижение экспрессии маркеров спецификации двигательных нейронов Islet1/2 (показано красным) и Foxp1 (показано зеленым на левом фото) одновременно с увеличением числа клеток, специфическим путем гибнущих в моторных столбах. **Г.** Схематичное описание фенотипов, связанных с утратой функции сигнального пути *Frizzled-3/PCP*. Нарушение выражается в преждевременном прекращении миграции аксона, направляющегося в дорсальную часть конечности, и сопровождается гибелью нейрона



С разрешения: Lisa Nilsson

О фотографии в начале главы

Изображение демонстрирует клетки головного нервного гребня, заселяющие жаберные дуги 42-часового зародыша *Danio rerio*, выделяющиеся на общем фоне по экспрессии GFP, управляемой промотором *fli1a*. Показан вид сбоку, перед расположен слева. Первые два крупных потока несут клетки нервного гребня к основным хрящам челюсти, задние потоки — к висцеральным дугам и структурам жабр. Клетки головного нервного гребня играют главную роль в построении скелета лицевого и мозгового черепа (лица) как у рыб, так и у людей. Совсем недавно стало понятно, что клетки головного нервного гребня действуют путем совместной миграции — по механизму, описанному в данной главе. Строение жаберных дуг, образующихся из клеток нервного гребня, может показаться сложным, хотя есть способ, которым вы можете постигнуть эти структуры в прямом смысле. Отправляйтесь на веб-сайт Национального института здоровья США (<http://3dprint.nih.gov/discover/3dpx-001506>), скачайте файл с трехмерным изображением жаберных дуг 42-часового трансгенного зародыша *Danio rerio* [*tg (fli1a: EGFP)*] и используйте этот файл, чтобы напечатать трехмерную модель, которую вы сможете держать в руках. (Трехмерное моделирование выполнено и предоставлено лабораторией Баррези; Barresi et al., 2015.)

15

Коротко

Клетки нервного гребня и специфичность аксонов

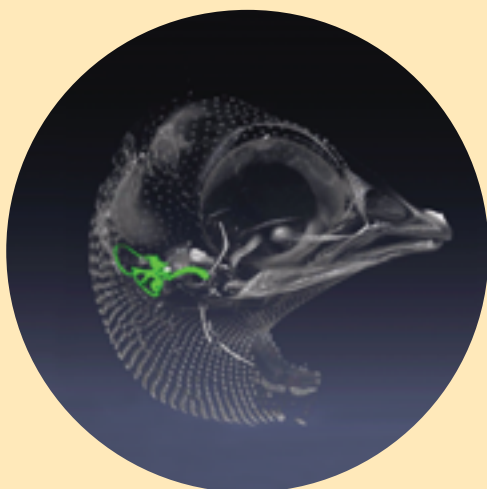
1. Нервный гребень представляет собой переходную структуру. Его клетки мигрируют, давая начало множеству клеток других типов. Путь миграции клеток нервного гребня зависит от внеклеточного матрикса, с которым они сталкиваются.
2. Клетки туловищного нервного гребня могут мигрировать дорсально-латерально, чтобы стать меланocyтами и клетками ганглиев дорсальных корешков. Они могут мигрировать и вентрально, становясь симпатическими и парасимпатическими нейронами и клетками коры надпочечников.
3. Клетки головного нервного гребня входят в состав жаберных дуг, становясь хрящами челюсти и косточками среднего уха. Они формируют также кости лобно-носового отростка, зубной сосочек (в том числе одонтобласты — клетки, формирующие дентин) и черепные нервы.
4. Клетки сердечного нервного гребня входят в сердце и формируют септу (разделительную перегородку) между легочной артерией и аортой.
5. Формирование нервного гребня зависит от взаимодействия между проспективным эпидермисом и нервной пластинкой. Паракринные факторы, выделяемые этими областями, индуцируют синтез транскрипционных факторов, позволяющих клеткам нервного гребня эмигрировать.
6. Коллективная миграция клеток нервного гребня обусловлена контактным ингибированием локомоции и привлечением к лидирующим клеткам.
7. Клетки туловищного нервного гребня мигрируют через переднюю часть каждого склеротома, но не через заднюю его часть. Белки семафорины и эфрины, экспрессируемые клетками задней части каждого склеротома, могут предотвращать миграцию клеток нервного гребня.
8. Одни клетки нервного гребня способны давать широкий спектр разных клеточных типов. Другие могут быть ограничены в этом еще до миграции. Пункт назначения клеток нервного гребня иногда может менять их спецификацию.
9. Путь развития клеток головного нервного гребня находится под влиянием Нох-генов. Эти клетки могут приобретать свой паттерн экспрессии Нох-генов путем взаимодействия с соседними клетками.
10. Двигательные нейроны специфицируются в соответствии с их положением в нервной трубке. Семейство транскрипционных факторов Lim играет важную роль в их спецификации до момента, когда аксоны этих нейронов достигнут периферии.
11. Конус роста — локомоторная органелла нейрона, перестраивающая свой цитоскелет в ответ на сигналы окружающей среды. Аксоны могут находить свои мишени в отсутствие нейронной активности.
12. Некоторые белки «разрешают» адгезию нейрона и образуют субстрат, по которому аксон может мигрировать. Другие субстраты «запрещают» миграцию.

13. Некоторые конусы роста распознают молекулы, представленные на очень специфических участках, и направляются этими молекулами к своим соответствующим мишеням.
14. Некоторые нейроны «держат строй» благодаря отталкивающим молекулам. Если нейрон уходит с пути к своей мишени, эти молекулы возвращают его обратно. Такие молекулы, как семафорины и Slit, селективно отторгают отдельные группы нейронов.
15. Некоторые нейроны, например нетрины и Shh, воспринимают градиенты белков и достигают своей мишени, следуя этим градиентам.
16. Изменения в способности ростового конуса отвечать на привлекающие и отторгающие сигналы, исходящие из средней линии, позволяют комиссуральным аксонам пересекать среднюю линию и соединять две стороны центральной нервной системы.
17. Выбор мишени может происходить за счет нейротрофинов — белков, выделяемых тканью-мишенью и стимулирующих конкретный набор аксонов к иннервации этой ткани. В ряде случаев мишень производит лишь то количество таких факторов, какое необходимо для поддержания этого аксона.
18. Ганглиозные клетки сетчатки у лягушки и курицы посылают аксоны, связывающиеся со специфичными областями в зрительном тектуме. Этот процесс опосредован многочисленными взаимодействиями, и выбор мишени регулируется за счет эфринов.
19. Формирование синапсов осуществляется в том числе благодаря нейронной активности. Активный нейрон может подавлять формирование синапса другого нейрона на этой же мишени.
20. Неспособность к нейронной активности и формированию синапса может приводить к индукции программированной клеточной смерти, или апоптоза, который «спускает с цепи» каскад каспаз, приводящий к гибели клетки.

Эктодермальные плакоды и эпидермис

16

Вы слышали, что внутреннее ухо
возникает снаружи?



Из: A. Kumar et al. 2018. *Birth Defects Research* 110:
1194–1204, с разрешения Nobue Itasaki

Есть ирония в том, что развитие некоторых из наших четырех чувств зависит от того, как разные эктодермальные клетки «чувствуют» друг друга посредством контактов и других молекулярных путей коммуникации для управления развитием сложных и тесно взаимосвязанных систем органов чувств. Наши органы зрения, слуха и запаха, и даже волосы на нашей коже возникают как простые утолщения поверхностной эктодермы, называемые плакодами. Плакоды, как и эпидермис кожи, сформированы ненейральной эктодермой, остающейся снаружи, после того как нейральная эктодерма движется внутрь, формируя центральную и периферическую нервную систему.

Ненейральные плакоды возникают в результате взаимодействия с окружающими клетками и тканями энтодермы, мезодермы и нервной пластинки, и эти взаимодействия различны для разных плакод. В голове **сенсорные плакоды** порождают обонятельный эпителий органов носа, целиком — внутреннее ухо, ответственное за восприятие звука и чувство равновесия, хрусталик глаза и дистальную часть черепных сенсорных ганглиев (Streit, 2007, 2008; Steventon et al., 2014; Saint-Jeannet and Moody, 2014; Schlosser, 2010, 2014; Moody and LaMantia, 2015). Несенсорные плакоды порождают эпителий полости рта, в котором развиваются зубы, и кожные структуры по всему телу, такие как волосы, перья, молочные и потовые железы (Pispa and Tesleff, 2003).

В этой главе мы уделим особое внимание важности реципрокных взаимодействий в дифференцировке плакод и схожести сигнальных путей, координирующих развитие плакод от головы до черепашьего панциря.

Черепные плакиды: чувства нашей головы

Голова позвоночных несет уникальное число органов чувств, которые суть не только содержащиеся в них нейроны. Глаза, нос, уши, вкусовые сосочки — все расположены на голове. На голове имеется также собственная высокоразвитая нервная система болевой (вспомним о тройничном нерве, иннервирующем наши зубы) и температурной чувствительности (вспомним о рецепторах наших губ и языка). Элементы этой нервной системы возникают из **черепных сенсорных плакод** — локальных и переходных утолщений эктодермы в головном и шейном эмбриональных отделах. Предшественники черепных сенсорных плакод происходят из ранней бластодермы как смешанная популяция клеток-предшественников центральной нервной системы (ЦНС), плакод, нервного гребня и эпидермиса. Клетки-предшественники прогрессивно дифференцируются и сортируются в ходе гастрюляции (**рис. 16.1**). При определенном участии нервного гребня краниальные плакиды производят большинство чувствительных ней-

ронов головы, ассоциированных со слухом, чувством равновесия, обонянием, вкусом, болевой чувствительностью, температурной и тактильной чувствительностью и даже кровяным давлением; из черепного нервного гребня происходят все глиальные клетки и проксимальные части чувствительных ганглиев (Singh and Groves, 2016).

Передние черепные плакиды:

- аденогипофизарная плакода, которая сначала развивается в структуру, известную как карман Ратке, после чего дифференцируется в переднюю долю гипофиза;
- хрусталиковая плакода впячивается, формируя хрусталиковый пузырь, который затем формирует хрусталик глаза. Аденогипофизарная и хрусталиковая — единственные черепные плакиды, которые не формируют сенсорных нейронов;
- обонятельная плакода порождает сенсорные нейроны, вовлеченные в обоняние (1-й черепной нерв — обонятельный), а также разнообразные мигрирующие нейроны, которые переселяются в мозг, включая, среди прочего, нейроны, синтезирующие гонадотропин-рилизинг-гормон.

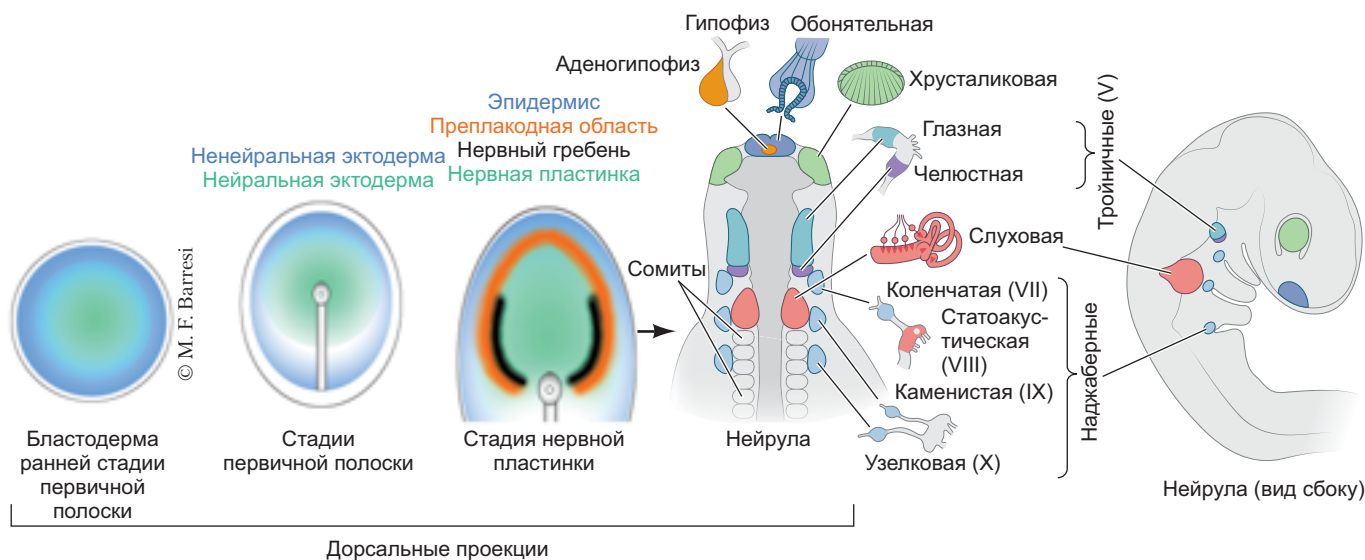


Рис. 16.1. Черепные сенсорные плакиды участвуют в образовании сенсорных органов и черепных ганглиев. На диаграммах дано схематичное изображение эмбриона амниот на стадиях от бластодермы до нервной трубки. На стадиях бластулы и ранней гастрюлы предшественники плакод перемешаны с клетками будущей нервной пластинки и нервного гребня на границе презумптивной нервной пластинки и поверхностной эктодермы, где первоначально перекрывается экспрессия нейрального (*синий*) и ненейрального (*голубой*) эктодермальных генов-маркеров (участок от *зеленого* к *синему*, бластодерма), а затем разграничивается (первичная полоска). Плакиды впервые специфицируются на стадии нервной пластинки в преплакодной области (*зеленый*). Преплакодная область отличается от домена с клетками нервного гребня, которым предстоит мигрировать в место его образования (*красный*), а потом этот домен разделяется на отдельные плакиды на стадии нервной трубки. Возникающие системы обозначены разными цветами на показанном дорсальном ракурсе стадии нервной трубки. Латеральный ракурс эмбриона поздней стадии нервной трубки также показывает расположение этих плакод. (По данным: A. Streit, 2004. *Dev Biol* 276: 1–15, A. D'Amico-Martel and D. M. Noden, 1963. *Am J Anat* 166: 445–468; S. Singh and A. K. Groves, 2016. *WIREs Dev Biol* 5: 363–376.)

Промежуточные черепные плакоды:

- тройничная плакода подразделена на офтальмическую и максилломандибулярную плакоды и порождает дистальные нейроны тройничного ганглия, тогда как проксимальные его нейроны формируются из клеток нервного гребня (Baker and Bronner-Fraser, 2001; Hamburger, 1961). Тройничный (5-й черепной) нерв обеспечивает чувства прикосновения, температуры и боли.

Задние черепные плакоды:

- слуховая плакода, порождающая сенсорный эпителий внутреннего уха и нейроны, формирующие вестибулокохлеарный ганглий (8-й черепной нерв), важные для передачи звуковой и вестибулярной информации в мозг;
- у анималий (рыб и амфибий) **плакоды боковой линии** порождают эпителиальные чувствительные органы, содержащие механочувствительные волосковые клетки и иннервирующие их нейроны; они расположены вдоль тела поверхностно для обеспечения восприятия потока воды.
- **Эпибранхиальные или наджаберные плакоды** включают **коленчатую, каменистую и узелковую плакоды**, образующие дистальные части различных черепных нервов (7-й, 9-й и 10-й). Нервы, возникшие из коленчатой плакоды, иннервируют вкусовые сосочки, ноздри и уши; нервы, происходящие из каменистой плакоды, иннервируют язык и каротидный синус с телом; происходящий из узелковой плакоды блуждающий нерв иннервирует множество различных органов тела, таких как сердце, легкие, желудочно-кишечный тракт.

Индукция черепных плакод

Детальные исследования карты презумптивных зачатков клеток на стадии нейрулы показали, что предшественники всех черепных плакод находятся в подковообразном домене (преплакодная область), который окружает переднюю нервную пластинку и черепные нервные валики (см. рис. 16.1; Kozlovsky et al., 1997; Streit, 2002; Bhattacharyya et al., 2004; Xu et al., 2008; Pieper et al., 2011). Предшественники индуцируются сигналами из головной мезодермы и энтодермы с некоторым участием сигналов из нервной пластинки (рис. 16.2; Platt, 1986; Brugmann et al., 2004; Schlosser and Ahrens, 2004; Litsiou et al., 2005; Schlosser, 2005; Streit, 2018). Джекобсон (Jacobson) в 1963 г. показал, что презумптивные плакодные клетки, расположенные рядом с передней нервной пластинкой, могут образовывать все плакоды амфибий. Позже исследования на амниотах показали, что на стадиях нервной пластинки преплакодная область является единственным доменом, реагирующим на сигнал, индуцирующий образование плакод. Индукция преплакодной области в основном проис-

ходит под влиянием сигналов из подлежащих тканей. Сигнальная система включает Wnt-белки и Bmp-факторы, а также их репрессию Fgf и антагонистами этих факторов (возможно, Cerebrus) (рис. 16.2А, Б). Сначала она обеспечивает отделение нервной пластинки от латерально расположенного ненейрального эпидермиса. Fgf и Wnt/Bmp-антагонисты из подлежащей головной мезодермы индуцируют преплакодную спецификацию, репрессируя активность Wnt и Bmp в окружающих областях эктодермы (Streit, 2007; Nakajima, 2015; Singh and Groves, 2016; Scghlosser 2017). В дополнение к этому Sonic hedgehog и нейропептидная сигнализация, наряду с ретиноевой кислотой влияют на переднезадние и латеральные границы преплакодных полей соответственно (Kondoh et al., 2000; Janesick et al., 2012; Hintze et al., 2017; Streit, 2018).

Вышеупомянутые паракринные системы обеспечивают индукцию специфичных генных регуляторных сетей в пределах преплакодной области, которая начинается с экспрессии транскрипционных факторов Six1/4 и Eya1/2 (рис. 16.2В). Эти белки присутствуют во всех плакодах, и их экспрессия подавляется в областях между ними, по мере разделения преплакодной области на отдельные плакоды (Streit, 2002; Bhattacharyya et al., 2004; Schlosser and Ahrens, 2004; Xu et al., 2006; Breaux and Schneider-Maunoury, 2014; Singh and Groves, 2016). Разные сочетания паракринных факторов затем индуцируют каждую отдельную плакоду в направлении пути ее развития, так что в каждой плакоде экспрессируется уникальный набор транскрипционных факторов (Groves and LaBonne, 2014; Moody and LaMantia, 2015; Chen et al., 2017).

Чтобы проиллюстрировать взаимодействия тканей и генные регуляторные сети, участвующие в развитии плакод, мы рассмотрим: 1) одновременное возникновение и разделение слуховой и эпибранхиальной плакод; 2) морфогенез формирования хрусталика.

Развитие слуховой и эпибранхиальной плакод: общий опыт

Чувства слуха и равновесия обеспечиваются преобразованием механической информации в электрические стимулы специализированными клетками во внутреннем ухе, чувствительными волосковыми клетками. Они расположены на сенсорных участках в основании полукружных каналов, ответственных за восприятие равновесия и ускорения, и в улитке или базилярном сосочке, обеспечивающих восприятие звука. У амниот звуковые колебания воздуха сначала улавливают особые складки внешнего уха и направляют на барабанную перепонку, заставляя ее вибрировать. Вибрации усиливаются движением трех костей в среднем ухе (самых маленьких костей

Внутреннее ухо — это самая замечательная слуховая машина с длинной историей эволюционных адаптаций. Как нам построить орган с такой сложной морфологией, спецификацией пятидесяти различных типов клеток и координацией их морфогенеза — и все из простой плакиды?

СЛУХОВАЯ И НАДЖАБЕРНАЯ ИНДУКЦИЯ

Те же сигналы, которые детерминируют предшественников плакод, вновь вступают в игру при инициации развития слуховой и наджаберной плакод. Сначала Fgf-сигнализация из подлежащей головной мезодермы индуцирует формирование статоакустических предшественников из задней части преплакодной области. Вскоре эту регуляцию усиливает Fgf из глоточной энтодермы и нервной пластинки (рис. 16.3). Wnt-сигналы, также исходящие из нервной пластинки, детерминируют развитие в сторону развития уха, репрессируя эпибранхиальное развитие. В слухо-

вой плакоде регуляторный путь Notch усиливает активность Wnt, таким образом детерминируя развитие уха. Позже активация Bmp-сигнальных путей из глоточной энтодермы поддерживает дифференцировку эпибранхиальных нейронов. Таким образом, Fgf-сигналы индуцируют предшественники обеих плакод, тогда как Wnt-сигнальные пути необходимы для разделения ушной и наджаберной плакод (Ladher et al., 2010; Nakajima, 2015; Sai and Ladher, 2015; Ladher, 2017).

МОРФОГЕНЕЗ ОРГАНОВ СЛУХА

Вскоре после того как слуховая плакода начинает утолщаться, изменения в форме клеток вдоль апикально-базальной оси приводят к инвагинации плакиды (рис. 16.4А, Б). Сначала базальные поверхности клеток плакиды увеличиваются по сравнению с апикальными поверхностями, отчего возникает впячивание — это соответствует стадии образования

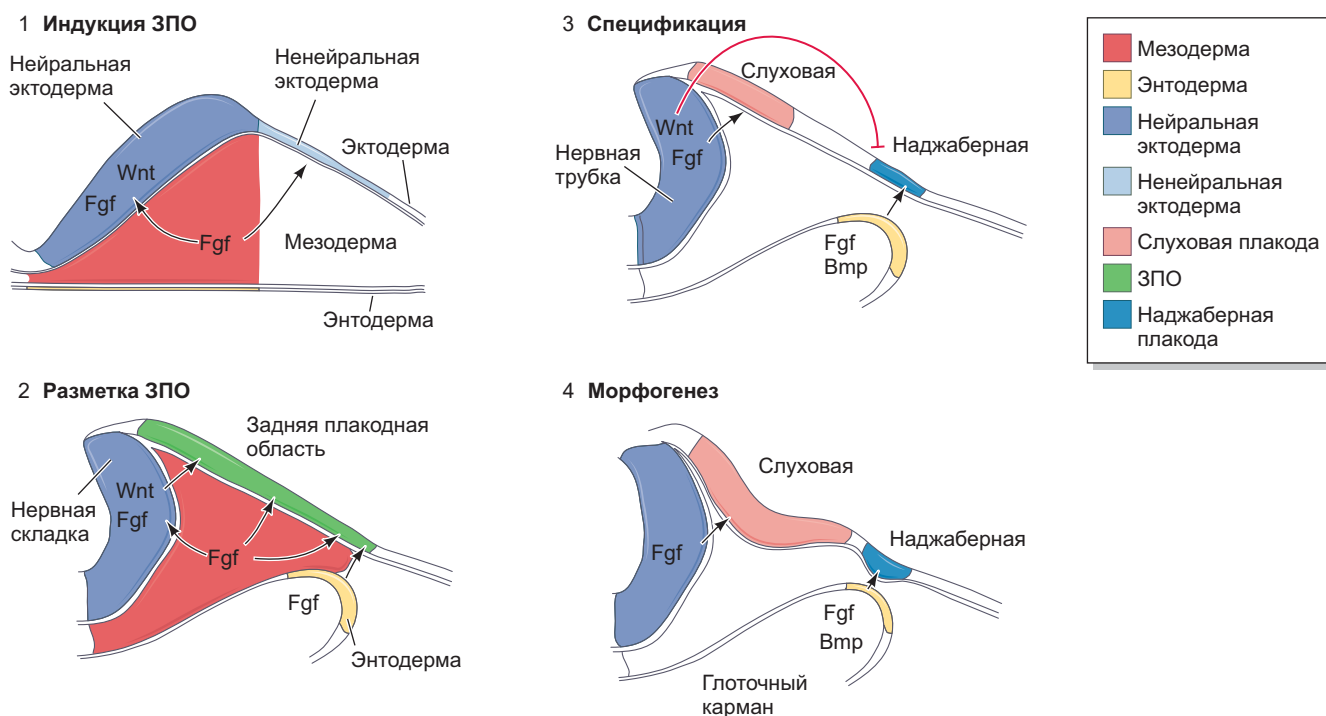


Рис. 16.3. Последовательные стадии индукции статоакустической плакиды (САП). (1, 2) Сигнальный путь Fgf активирует Wnt и Fgf в нейральной эктодерме (голубой). (1) Сначала клетки в задней части преплакодной области ненейральной эктодермы индуцируются в сторону статоакустических предшественников производимыми мезодермой Fgf-сигналами (ЗПО — задняя плакодная область). (2) В это время больше Fgf производится глоточной энтодермой (желтый). (3, 4) САП подразделяется на отдельные плакиды. (3) Wnt-сигнальная система детерминирует слуховую (розовый) и репрессирует эпибранхиальное (синий) развитие. (4) Одновременно продолжительное воздействие Fgf-сигнальной системы активирует эпибранхиальную программу, и Bmp-факторы из латеральной энтодермы иницируют эпибранхиальный нейрогенез. (По данным: R. K. Ladher et al., 2010. *Development* 137: 1777–1785.)

слуховой ямки. Первоначальное углубление затем увеличивается, чему способствуют силы апикальной констрикции, что означает наступление фазы **слуховой чаши**. Наконец, слуховая чаша формирует слуховой пузырь, сводя края вместе, сращивая их и отделяя чашу, как пузырь, от поверхностной

эктодермы (Sai and Ladher, 2008; Sai and Ladher, 2015; Ladher, 2016). Механизмы, обеспечивающие отделение слухового пузыря, до сих пор большей частью неизвестны, но гипотетически они схожи с клеточными процессами, приводящими к закрытию нервной трубки (см. гл. 13).

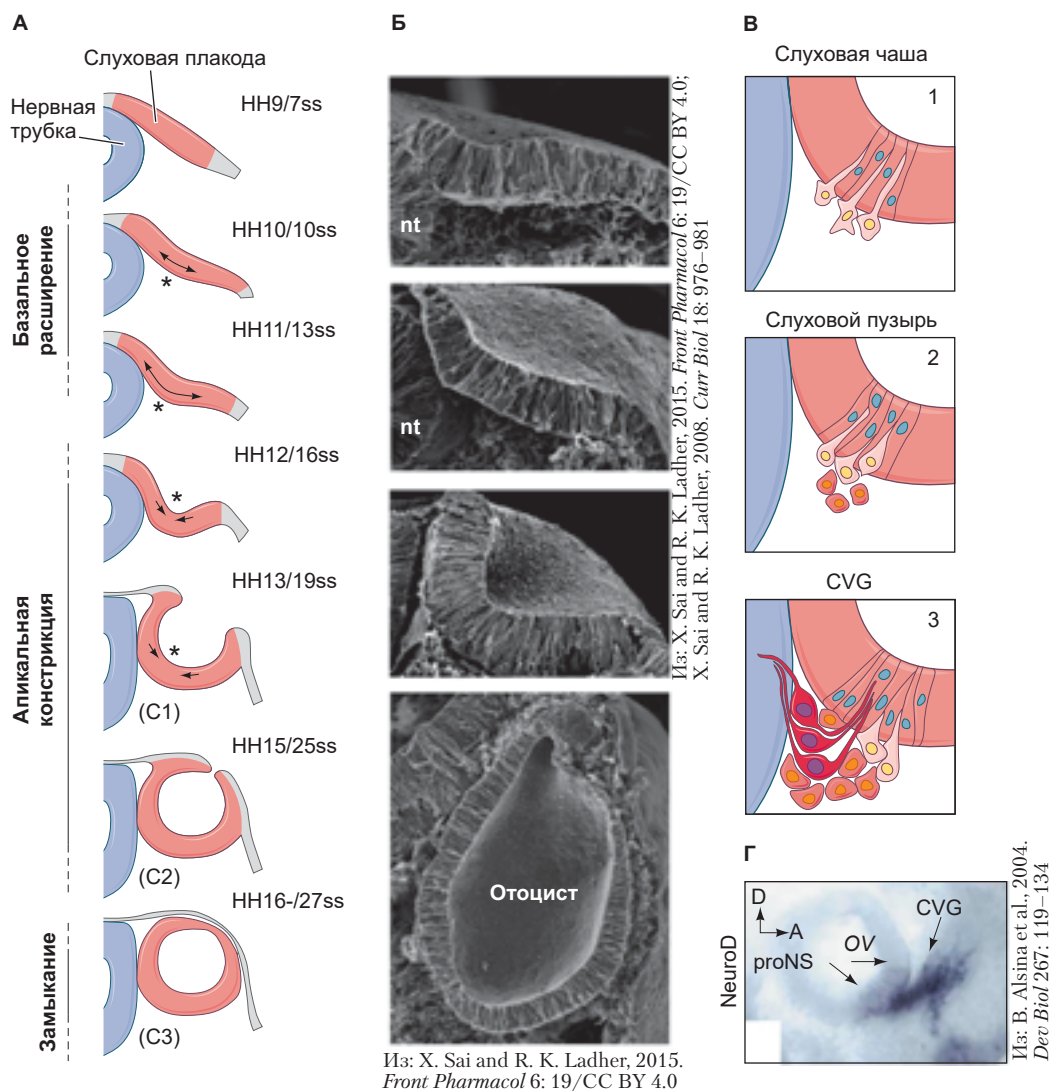


Рис. 16.4. Морфогенез слуховой плакиды и пузыря. **А, Б.** Инвагинация преплакодной эктодермы рядом с будущим задним мозгом в области развивающейся слуховой плакиды цыпленка показана в диаграммах (**А**; ss — стадия сомитов; C1–C3 показывают соответствующие диаграммы на **В**) и на фотографиях, полученных на сканирующем электронном микроскопе (**Б**; nt — нервная трубка; отоцист — слуховой пузырь). Впячивание сначала обусловлено расширением базальных поверхностей эпителиальных клеток, за которым следует констрикция апикальных поверхностей (звездочки, стрелки). **В.** Нейральные клетки-предшественники (светло-красные клетки с оранжевыми ядрами) вдоль вентромедиальной части слуховой чаши (1) и пузыря (2) отслаиваются от эпителия (розовые клетки с желтыми ядрами) и дифференцируются в кохлеовестибулярный (улиткопреддверный) ганглий (3, CVG — красные нейроны с пурпурными ядрами). **Г.** NeuroD — маркер генной экспрессии (синий) для пронейросенсорного домена (proNS) слухового пузыря (OV) и для деляминаровавшихся нейробластных клеток, мигрирующих в CVG. (Рис. А–В по данным: X. Sai and R. K. Ladher, 2015. *Front Pharmacol* 6: 19/CC BY 4.0; X. Sai and R. K. Ladher, 2008. *Curr Biol* 18: 976–981; R. K. Ladher, 2017. *Semin Cell Dev Biol* 65: 39–46.)

Загадки развития

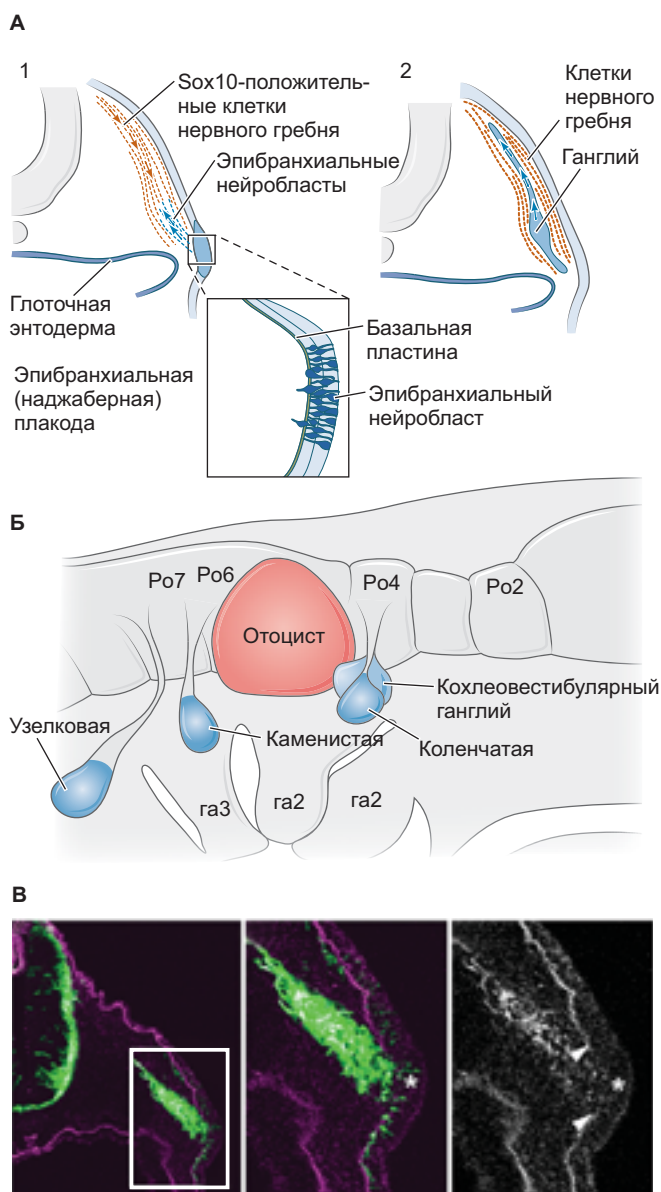
Существует много вопросов относительно развития органов слуха. Как сформировать множество разных волосковых клеток, чувствительных к разным частотам и с разными физиологическими свойствами? Как волосковые клетки с разной морфологией возникают и пространственно организуются в соответствии с их тоновой чувствительностью?

ДЕЛАМИНАЦИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ

Большинство плакод порождают чувствительные нейроны. Последние образуют кластеры клеточных тел нейронов, известные как **ганглии**, которые, в свою очередь, синтезируют волокна для прорастания черепных нервов. Ганглии возникают из слуховой и эпибранхиальной плакод путем клеточной **деламинации** — процесса, при котором эпителиальные клетки теряют плотные контакты друг с другом и мигрируют из многослойного эпителия. Эпителиальные клетки, находящиеся на вентромедиальной стороне слуховой чаши и пузыря, производят нейральные предшественники, которые деламинируют как нейробласты в течение продолжительного периода времени путем, не включающем в себя эпителио-мезенхимный переход (рис. 16.4В, Г). Нейральные клетки-предшественники дифференцируются, образуя **кохлеовестибулярный** (преддверноулитковый) **ганглий**, находящийся рядом со слуховым пузырем

Рис. 16.5. Эпибранхиальные чувствительные нейроны деламинируют от плакodes как нейробласты. **А.** Нейральные предшественники эпибранхиальных сенсорных нейрональных деламинируют с базальной поверхности плакodes (1). «Эпибранхиальные нейробласты» мигрируют в дорсальном направлении между устремляющимися вентрально клетками нервного гребня. **Б.** Латеральный вид окончательного расположения слухового пузыря (отоцист), улиткопреддверного ганглия и эпибранхиальных (наджаберных) плакод (коленчатой, каменистой и носовой), образующих дистальные части 7-го, 9-го и 10-го черепных нервов. (га — глоточная арка; Ро — ромбомер нервной трубки). **В.** Поперечный срез 2,5-дневного эмбриона цыпленка курицы на уровне эпибранхиальной плакodes, с нейробластными предшественниками преддверноулиткового ганглия (*зеленый*) и базальной пластины (*пурпурный*), меченными антителами к средней цепи нейрофиламента и ламинину соответственно. Два изображения справа — увеличенный вид обведенной зоны левого изображения. Базальная пластина уменьшается только там, где происходит деламинация нейробластов (*звездочки*). Протяженность разрыва базальной пластины показана *стрелками* (последнее изображение). (Рис. А, Б по данным: R. K. Ladher et al., 2010. *Development* 137: 1777–1785.)

(отоцистом), которому предстоит сформировать нейрональные контакты между мозгом и структурами внутреннего уха, происходящими из отоциста (Hermond and Morest, 1991; Margrañños et al., 2012). Похожим образом нейрональные предшественники деламинируют, так же как нейробласты из эпибранхиальных плакод, но эти клетки продолжают миграцию в дорсальном направлении, по клеточным туннелям нервного гребня (**рис. 16.5**). Манипуляции, препятствующие миграции по нервному гребню, приводят к смещению эпибранхиального ганглия, и можно предположить, что клетки нервного гребня образуют указатели, задающие местоположение и/или архитектуру ганглия (Bedge and Graham, 2001; Golding et al., 2004; Osborne et al., 2005; Schwarz et al., 2008; Ladher et al., 2010; Freter et al., 2013; Ladher, 2017). Вместе эпибранхиальные нейробласты и популяции клеток нервного гребня формируют эпибранхиальные ганглии и нервы.



Из: A. Graham et al., 2007. *Development* 134: 4141–4145

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ОТ СЛУХОВОГО ПУЗЫРЯ ДО КОРТИЕВА ОРГАНА

Индукция и морфогенез слуховой плакиды в отоцист — это самые ранние события, происходящие при развитии внутреннего уха. Для осуществления вестибулярной (чувства равновесия и ускорения) и слуховой функций уха клетки отоциста должны быть распределены вдоль всех осей отоциста, для формирования одного из самых богатых по клеточному разнообразию и сложных органов, каким обладают позвоночные. Дорсальные части отоциста порождают три полукружных канала вестибулярной системы, тогда как вентральные порождают чувствительные и поддерживающие клетки улитки слуховой системы (**рис. 16.6А**). Мы подробно рассмотрим развитие улитки млекопитающих как пример использования основных морфогенетических сигналов, участвующих в разметках всего эмбриона, в разметке паттернов различных типов клеток вдоль осей внутреннего уха.

АНАТОМИЯ ВНУТРЕННЕГО УХА

Хотя скрученная форма улитки млекопитающих может показаться резко отличающейся от прямых или изогнутых гомологов у рептилий и птиц и хотя кортиев орган млекопитающих может казаться совершенно непохожим на базилярный сосочек наших водных четвероногих предков, развитие и функции этих структур эволюционно консервативны (Manley, 2012; Basch et al., 2016). Как сказано выше, улитка играет ключевую роль в преобразовании звуковых волн в электрические сигналы, так как чувствительные волосковые клетки расположены в кортиевом органе (**рис. 16.6Б**). Три ряда наружных и один ряд внутренних чувствительных волосковых клеток выстроены на всей протяженности кортиева органа и отращают свои механочувствительные микроворсинки в заполненную жидкостью камеру канала улитки. Волосковые клетки окружены особым образом организованными поддерживающими клетками: группы внутренних и внешних волосковых клеток

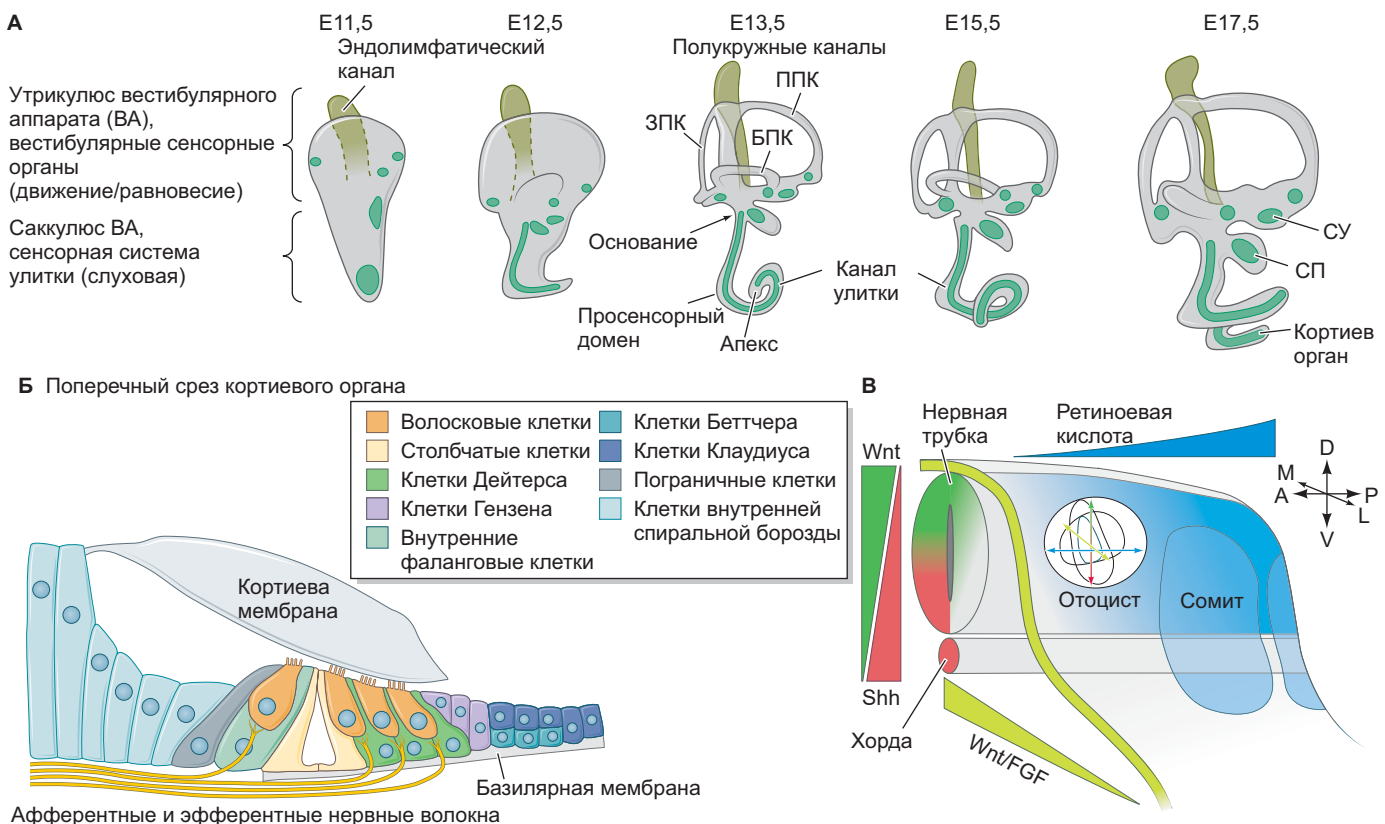


Рис. 16.6. Детерминация осей в слуховом пузыре. **А.** Показано развитие внутреннего уха в эмбрионах мыши от 11,5 (E11,5) до 17,5 (E17,5) дня развития. Области, в которых развиваются волосковые клетки показаны бирюзовым. Эндолимфатический проток (зеленый) представляет собой нечувствительный компонент внутреннего уха. (ППК, ЗПК и БПК — передний, задний и боковой полукружные каналы; СП — слуховое пятно саккулюса; СУ — слуховое пятно утрикулюса). **Б.** Поперечный срез кортиева органа млекопитающих, показывающий клеточные типы, составляющие эту структуру. **В.** Различные сигналы из окружающих тканей, влияющие на детерминацию осей отоциста. Цвета показывают градиенты сигналов, необходимые для разметки этих осей. (Рис. А, Б по данным: M. L. Basch et al., 2016. *J Anat*, 228: 233–254.)

разделены опорными клетками, образующими кортиев канал, внутренние волосковые клетки окружены фаланговыми и пограничными клетками, внешние волосковые клетки расположены прямо поверх клеток Дейтерса (фаланговых), которые отращивают специализированные фаланговые отростки к поверхности канала улитки (рис. 16.6Б; Bach et al., 2016). Как эти разнообразные типы клеток организуются в улитке?

ДЕТЕРМИНАЦИЯ ОСЕЙ ОТОЦИСТА

Прежде чем разовьются волосковые клетки улитки, должны быть определены оси отоциста. Как в случае со многими другими видами органогенеза, спецификация развития клеток вдоль оси слухового пузырька обусловлена такими же морфогенетическими сигналами, какие определяют основные оси эмбриона (рис. 16.6В). Уже на стадии слуховой чаши, как представляется, спецификация медиалатеральной оси осуществляется под влиянием сочетания сигнальных систем Wnt и Fgf из развивающегося заднего мозга. Эти сигнальные системы необходимы для формирования эндолимфатического протока и полукружных каналов вестибулярной части внутреннего уха (см. рис. 16.6А; Lin et al., 2005; Riccomagno et al., 2005; Brown et al., 2015). Противоположные морфогенетические градиенты Sonic hedgehog из вентральной нервной трубки (и хорды) и Wnt из дорсальной нервной трубки необходимы для разметки отоциста вдоль дорсально-вентральной оси.

Действительно, потеря сигнальной системы Sonic hedgehog во внутреннем ухе приводит к потере клеточных типов, происходящих из вентральной части (Brown and Epstein, 2011). Наконец, ретиноевая кислота важна для разметки клеточных траекторий вдоль передне-задней оси. В самом деле, в случае когда ретиноевая кислота сверхэкспрессирована или репрессирована спереди, клеточные траектории развития, характерные для задней части отоциста, расширяются за счет развития улитки (Bok et al., 2011). В гл. 17 мы увидим, что ретиноевая кислота имеет схожую роль в разметке передне-задней оси эмбрионального туловища. Таким образом, раннюю детерминацию клеточных траекторий в отоцисте в значительной мере определяет совместное действие существующих осевых морфогенов (Bach et al., 2016). Так или иначе, дальнейшая дифференцировка просенсорных и поддерживающих клеточных типов кортиева органа в улитке происходит в соответствии с менее общими, более органспецифичными механизмами, включая необычное отделение клеточной дифференцировки от процесса выхода из клеточного цикла и сложной пространственной и временной регуляции сигнальных путей в развивающемся отоцисте.

Морфогенез глаза позвоночных

Основные части эмбрионального глаза позвоночных — пигментный эпителий сетчатки, нейральная сетчатка и хрусталик. Тогда как эпителий и нейральная сетчатка образуются из центральной нервной системы, хрусталик, возникающий из хрусталиковой плакоды, происходит из ненейральной эктодермы. В отличие от большинства сенсорных плакод, хрусталиковая плакода не формирует нейроны. Вместо этого она формирует прозрачную линзу, фокусирующую поступающий свет на нейральную сетчатку. Сетчатка развивается из зрительного пузыря, который формируется как боковое выпячивание промежуточного мозга, являющегося частью переднего мозга. Взаимодействие клеток хрусталиковой плакоды с презумптивной сетчаткой образует глаз в результате каскада взаимовлияющих сигнальных событий, обеспечивающих формирование сложно устроенного органа.

Во время гаструляции инволюирующая прехордальная пластинка и энтодерма передней кишки взаимодействуют с покрывающей их преплакодной областью эктодермы, индуцируя в ней признаки, характерные для переднего конца эмбриона и придавая ей потенциалы, необходимые для формирования хрусталика (Saha et al., 1989; Dutta et al., 2005; Hintze et al., 2017). Эти ткани индуцируют набор «передних» генов, включая Pax6, кодирующий транскрипционный фактор, придающий эктодерме способность реагировать на поступающие затем сигналы. Интересно, что вся преплакодная область сначала определяется как хрусталиковая (Bailey et al., 2006), включая клетки, которые в норме формируют слуховую и другие плакоды. Поскольку не все части плакоды в конце концов формируют хрусталики, развитие хрусталиков в них должно репрессироваться так, чтобы хрусталик формировался только в условиях точного пространственного взаимодействия плакоды и сетчатки. Подавление потенциала развития хрусталика осуществляют мигрирующие клетки нервного гребня (von Woellworth, 1961; Bailey et al., 2006). Клетки нервного гребня заблокированы от контакта с прехрусталиковой областью разрастающимся глазным пузырем. Это подавление вместе с поступающими из **глазного пузыря** сигналами позиционирует хрусталик относительно сетчатки.

На **рис. 16.7** показано развитие глаза позвоночных. Глазной пузырь в точке своего контакта с головной эктодермой вызывает изменение формы клеток, что образует утолщенную хрусталиковую плакоду. После этого зрительный пузырь впячивается, формирует двуслойный **глазной бокал**, тем самым втягивая развивающийся хрусталик в формирующийся глаз. Впячивание обусловлено тремя изменениями. Во-первых, клетки хрусталиковой плакоды прорастивают адгезивные филоподии до установления контакта с глазным пузырем (Chauhan et al., 2009). Во-вторых, клетки на краю инвагинирующего слоя

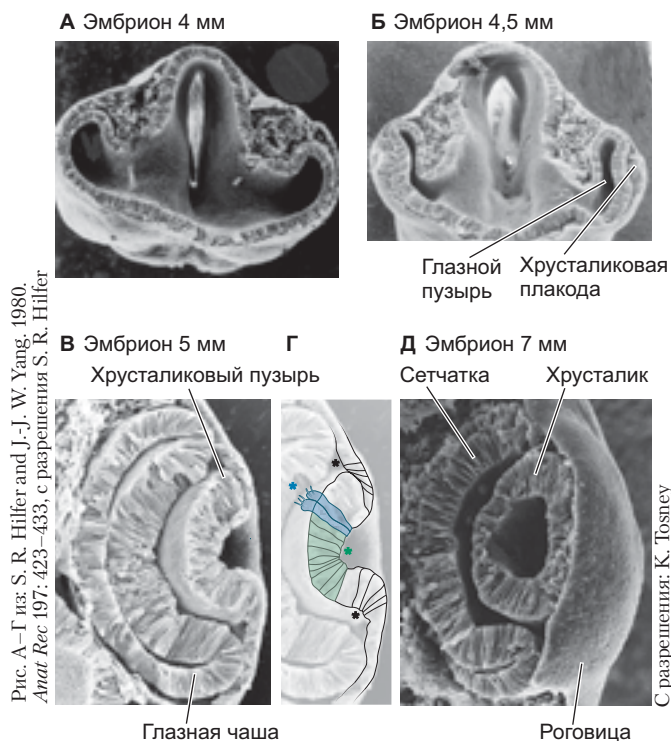


Рис. 16.7. Развитие и двунаправленная сигнализация в глазу позвоночного. **А.** Глазной пузырь выпячивается из мозга и контактирует с покрывающей эктодермой, индуцируя клетки хрусталиковой плакоды принять столбчатую форму. **Б, В.** Хрусталиковая плакода дифференцируется в клетки хрусталика. По мере того как глазной пузырь втягивается, хрусталиковая плакода становится хрусталиковым пузырем. **В.** Зрительный пузырь образует нейральную сетчатку и пигментированный эпителий сетчатки, в то время как хрусталик погружается внутрь пузыря. **Г.** Три принципиальных изменения формы клеток формирующегося хрусталика показаны на сканирующем электронном микроскопе: базальная констрикция (*черные звездочки*), апикальная констрикция (*зеленая звездочка*) и прорастание филоподий в сетчатку (*синяя звездочка*). **Д.** Хрусталик индуцирует превращение покрывающей эктодермы в роговицу

претерпевают базальную констрикцию. В-третьих, клетки в середине инвагинирующего слоя претерпевают в это время апикальную констрикцию.

По мере превращения глазного пузыря в глазной бокал два его слоя дифференцируются. Клетки наружного слоя производят меланин (будучи одной из немногих тканей, кроме клеток нервного гребня, способных к производству этого пигмента) и в конце концов становятся **пигментным эпителием** сетчатки. Клетки внутреннего слоя быстро делятся и производят множество различных клеток — глиальных, ганглиозных клеток, интернейронов и светочувствительных нейронов-фоторецепторов, которые вместе образуют **нейральную сетчатку**. В то время как фоторецепторы обеспечивают световосприятие, ган-

глиозные клетки сетчатки представляют собой нейроны, передающие информацию в мозг. Их аксоны сходятся вместе у основания глаза и протягиваются вниз по главному стеблю, который затем становится **зрительным нервом**. Двусторонняя сигнализация между клетками внутренней части глазного бокала (которая потом станет сетчаткой) и хрусталиковой плакодой необходима для дифференцировки сетчатки, формирования хрусталикового пузыря и дифференцировки хрусталиковых эпителиальных и волокнистых клеток.

Формирование глазного поля: образование сетчатки

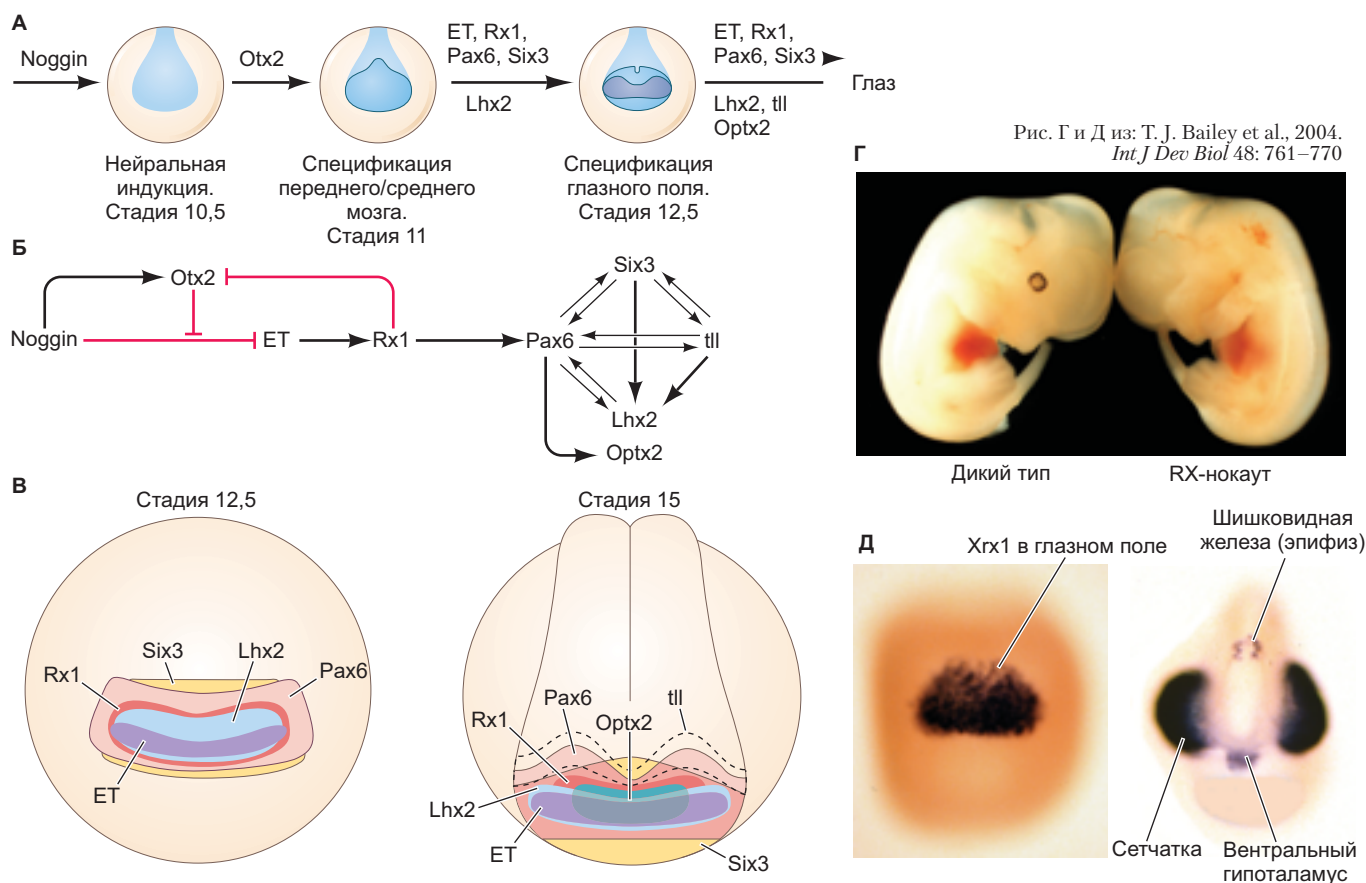
Тонкую организацию глаза обеспечивает множество индукционных воздействий, включающих различные сигналы и изменения генной экспрессии во времени и пространстве. Развитие сетчатки начинается с формирования глазного поля в передней части нервной пластинки на стадиях ранних сомитов. Переднюю часть нервной пластинки, в которой ингибированы сигнальные пути Bmp и Wnt, специализирует экспрессия Otx2. Особенно важен ген Noggin, поскольку он не только блокирует Bmp (тем самым делая возможной экспрессию Otx2), но и ингибирует экспрессию транскрипционного фактора ET, одного из первых генов, экспрессирующихся в глазном поле. Так или иначе, дифференциальная экспрессия Otx2 через дорсально-вентральную ось переднего мозга обеспечивает дифференциальную репрессию способности Noggin ингибировать экспрессию ET, таким образом допуская продуцирование там белка ET.

Один из контролируемых ET генов, Rx (ретиноидный гомеобокс), в свою очередь, необходим для детерминации сетчатки. Rx — это транскрипционный фактор двойного действия: во-первых, он ингибирует Otx2 и, во-вторых, активирует Pax6, главный ген, управляющий формированием глазного поля в передней части нервной пластинки (**рис. 16.8А–В**; Zuber et al., 2003; Zuber, 2010). Белок Pax6 особенно важен для детерминации хрусталика и сетчатки; он служит общим фактором детерминации развития светочувствительных клеток у большинства таксонов, позвоночных и беспозвоночных (Halder et al., 1995).

У людей и мышей, гетерозиготных по функционально значимым мутациям Pax6, уменьшенные глаза, а у гомозиготных мутантов, мышей и людей, глаз нет (см. рис. 4.13), впрочем, так же как и у мышей, и у *Danio rerio*, имеющих мутацию Rx (рис. 16.8Г; Jordan et al., 1992; Galser et al., 1994; Quiring et al., 1994; Rojas-Muñoz et al., 2005; Stigloher et al., 2006). У мух и позвоночных белок Pax6 запускает каскад транскрипционных факторов, таких как Six3, Rx и Sox2, с перекрывающимися функциями. Эти фак-

торы взаимно активируют друг друга, что приводит к образованию одного образующего глаза, поля в середине вентрального переднего мозга (рис. 16.8E; Tetrault et al., 2009; Fuhrmann, 2010). В конце концов образуются два глаза, расположенных на голове более латерально. Главным организатором разделения у позвоночных единственного глазного поля на два билатерально расположенных поля оказывается наш старый знакомый Shh.

Shh из прехордальной пластинки подавляет экспрессию *Pax6* в середине нервной трубки, разделяя поле надвое (**рис. 16.9**). Если у мыши ген *Shh* несет мутацию, подавляющую его функцию, или процессинг белка блокирован, единое, расположенное посередине глазное поле не разделяется. В результате развивается **циклопия** — единственный глаз, который находится в середине лицевой части, обычно под носом (см. рис. 16.6B; Chiang et al., 1996; Kelley et al.,

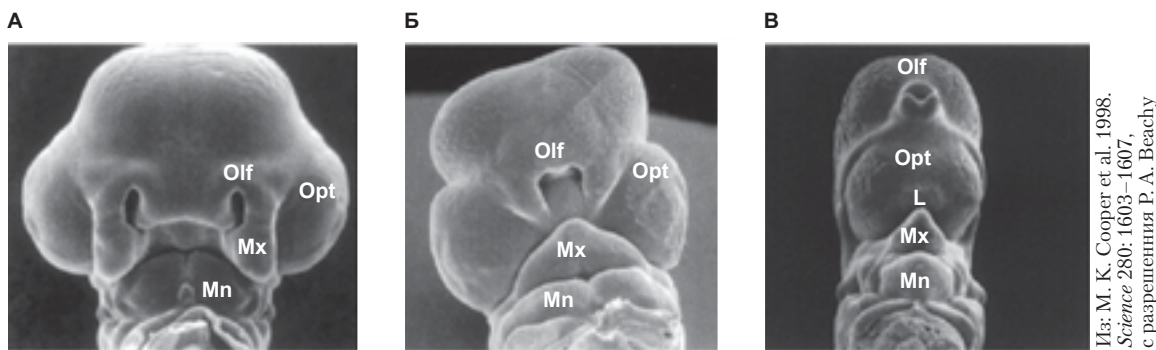


1996; Rossler et al., 1996). Наоборот, в случае если избыточное количество Shh синтезируется в прехордальной пластинке, экспрессия Pax6 подавляется на слишком большой площади и глаза не формируются. Это подавление может объяснять, почему пещерные рыбы слепы. Ямамото с соавторами в 2004 г. показали, что различие между популяциями мексиканской тетры, живущими в открытых водоемах (*Astyanax mexicanus*), и безглазыми пещерными популяциями того же вида, обусловлено количеством Shh, секретируемым прехордальной пластинкой. Повышение уровня Shh, возможно, преимущественно отбиралось в пещерных видах, так как оно приводит к повышению оральной чувствительности, включая увеличение обонятельных плакод и размера челюстей (Yamamoto et al., 2009). Так или иначе, Shh подавляет и экспрессию Pax6, что приводит к нарушению развития глазного бокала, апоптозу хрусталиковых клеток и остановке развития глаза (рис. 16.10). Девияция экспрессии Shh не единственный фактор, влияющий на развитие глаз и переднего мозга у пещерных рыб; недавние исследования тоже позволяют предполагать, что критичное влияние оказывают гетерохронии (изменения времени экспрессии) Fgf и экспрессия транскрипционных факторов Lhx (Rétaux et al., 2008; Pottin et al., 2011; Allié et al., 2018).

Индукционный каскад хрусталик–сетчатка

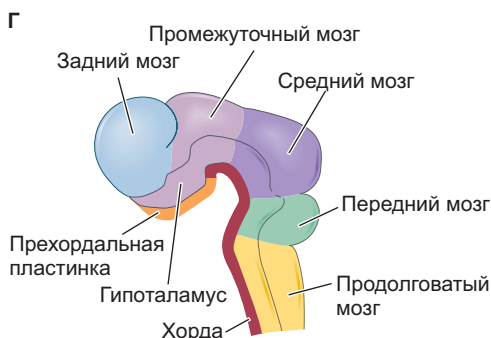
Как два поля формируют глаза после того как глазное поле разделилось надвое? Современные

исследования развития глаза позвоночных начинаются с работ Ганса Шпемана (Hans Spemann), который в 1901 г. обнаружил, что при разрушении презумптивной области глазного пузыря передней части нервной пластинки на одной стороне эмбриона амфибий хрусталик с этой стороны не формировался (см. рис. 4.11). Что-то в нервной пластинке оказывалось необходимым для формирования хрусталика. Вскоре после этого Уоррен Льюис (Warren Lewis, 1904) продолжил эти эксперименты на эмбрионах амфибий более старшего возраста. Он помещал глазной пузырь под эпидермальную эктодерму туловища, и хрусталик формировался в этом месте. Много лет такие эксперименты использовали как доказательство способности глазного пузыря индуцировать образование хрусталика эпидермальной эктодермой. Более поздние исследования, в которых определяли происхождение тканей, показали, что трансплантированные глазные пузыри, казалось бы, индуцировавшие эктопическое развитие хрусталика, были на самом деле контаминированы презумптивными хрусталиковыми клетками (Grainger, 1992; Ogino et al., 2012). Это свидетельствовало о том, что один только глазной пузырь нельзя считать достаточным источником сигналов для индукции хрусталика. На самом деле индукция хрусталика включает множество стадий, которые начинаются задолго до того, как глазной пузырь соприкасается с эпидермальной эктодермой. История показывает, что стадии развития хрусталика и сетчатки являются красивым примером двусторонней эмбриональной сигнализации (рис. 16.11).



Из: М. К. Cooper et al. 1998. *Science* 280: 1603–1607, с разрешения Р. А. Beachy

Рис. 16.9. Sonic hedgehog делит глазное поле на два билатерально расположенных поля. Алкалоид растительного происхождения иервин блокирует эндогенную сигнальную систему Shh. **А.** Сканирующая электронная микроскопия позволяет увидеть внешние лицевые структуры нормального эмбриона мыши. **Б.** На мышинных эмбрионах после действия 10 мкМ иервина можно обнаружить ту или иную потерю ткани средней линии и в результате этого слияние парных латеральных зрительных отростков (Olf), зрительных пузырей (Opt), а также максиллярных (Mx) и мандибулярных (Mn) отростков челюсти. **В.** Полное слияние глазных пузырей и хрусталиков (X) приводит к циклопии у мыши. **Г.** Локализация прехордальной пластинки (источника Shh) у двенадцатидневного эмбриона мыши



Как говорилось ранее, нервная эктодерма должна стать компетентной, чтобы отвечать на индукцию хрусталика. Джекобсон (Jacobson, 1963; 1966) показал, что эктодерма первоначально испытывает влияние прехордальной мезодермы и передней энтодермы ближе к концу гастрюляции. Эти ткани насыщают будущую хрусталиковую область антагонистами, блокирующими Bmp- и Wnt-сигнализацию, а также FGF и нейропептидами. Данные ткани и сигналы необходимы для индукции *Pax6* и других генов, специфичных для передней эктодермы (Donner et al., 2006; Lleras-Romero et al., 2013).

В это время в мозге билатерально расположенные глазные поля впячиваются, по мере того как Rx

активирует ген *Nlcam*, белок которого локализуется на поверхности клеток и регулирует билатеральные впячивания (Brown et al., 2010; Bazin-Lopez et al., 2015). Эти впячивания становятся глазными пузырями.

Когда клетки глазных пузырей касаются поверхностной эктодермы, происходит изменение в обеих тканях. Клетки глазного пузыря уплощаются вдоль поверхностной эктодермы и производят Bmp4, Fgf8 и Delta (Furuta and Hogan, 1998; Faber et al., 2002; Plageman et al., 2010; Ogino et al., 2012). Эти сигналы обеспечивают элонгацию клеток поверхностной эктодермы и приобретение ими плакодной морфологии. Когда хрусталиковая плакода сформировалась, она секретирует Fgf-факторы, которые вызывают в ближайших клетках глазного пузыря активацию гена *Vsx2*, характерную для нейральной сетчатки.

Мезенхима, происходящая из нервного гребня и окружающая глазной пузырь, стимулирует в большинстве клеток наружных слоев глазного пузыря активацию гена *Mitf*, который, в свою очередь, активирует производство пигмента меланина (Burmeister et al., 1996; Nguyen and Arnheiter, 2000). Таким образом, наиболее дистальная часть глазного пузыря (клетки которой контрактируют с поверхностной эктодермой) стимулируется к образованию нейральной сетчатки, тогда как соседние с этой областью клетки получают стимулы, направляющие их развитие в сторону пигментного эпителия (Fuhrmann, 2010).

Теперь презумптивная нейральная сетчатка устанавливает адгезивные контакты с хрусталиковой плакодой и втягивает ее внутрь по мере того как глазной пузырь меняет свою форму, превращаясь в глазной бокал. Fgf-факторы из глазного бокала активируют в хрусталиковой плакоде новый набор генов, трансформирующих плакodu в хрусталиковый пузырь, в котором формируются клетки хрусталика.

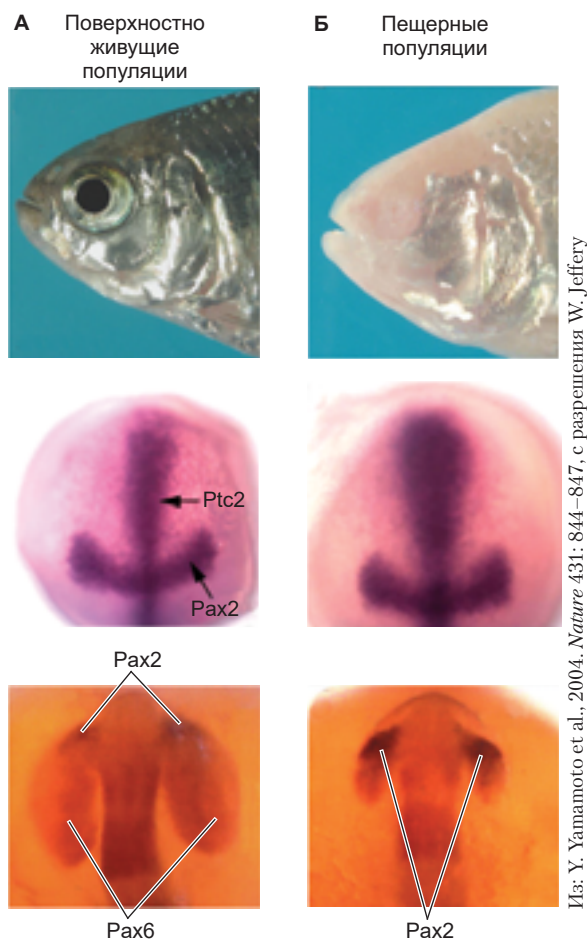
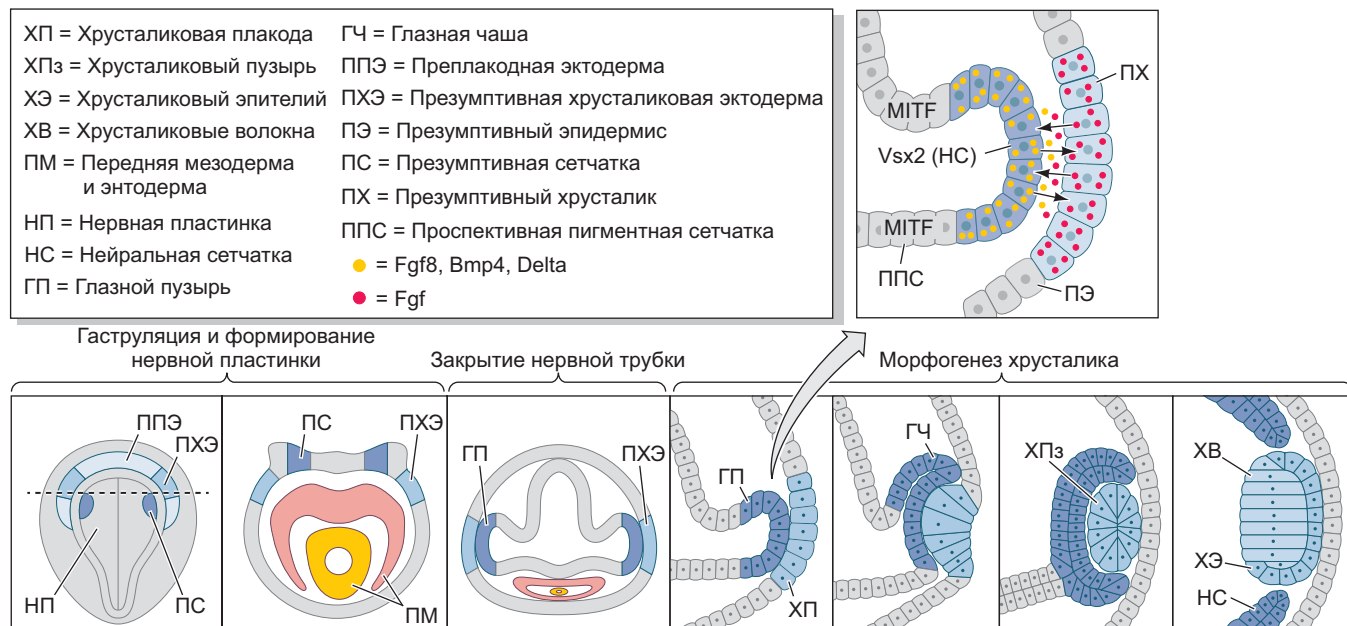


Рис. 16.10. Поверхностно живущие (А) и пещерные (Б) мексиканские тетры (*Astyanax mexicanus*). Глаз не развивается у популяций, более 10 000 лет живущих в пещерах (вверху справа). В пещерах у эмбрионов два гена *Ptc2* и *Pax2* реагируют на Shh и экспрессируются в более широких доменах, чем в популяциях, обитающих в открытых водоемах (середина). Эмбриональные глазные пузыри (внизу) обитателей открытых водоемов имеют нормальный размер и небольшие домены экспрессии *Pax2* (определяющие зрительный ствол). Глазные пузыри эмбрионов пещерных рыб (у которых обычно экспрессируется *Pax6*) гораздо меньше, а домен экспрессии *Pax2* увеличивается за счет домена экспрессии *Pax6*

Эпидермис и кожные придатки

Кожа — плотная эластичная водонепроницаемая мембрана, самый большой орган нашего тела. Кожа млекопитающих состоит из трех основных компонентов: 1) многослойного эпидермиса; 2) подлежащей дермы, состоящей из неплотно расположенных фибробластов; 3) происходящих из нервного гребня меланоцитов, находящихся в базальном слое и волосяных фолликулах. Меланоциты (см. гл. 15) определяют кожную пигментацию. Кроме этого, под дермой находится слой подкожного жира. Эпидермис нашей кожи постоянно обновляется: у обычного человека это происходит так интенсивно, что за год кожей можно было бы покрыть пять кроватей королевского размера! Эту регенерационную способность обеспечивает популяция эпидермальных стволовых клеток, сохраняющаяся на протяжении всей жизни.

А



Б

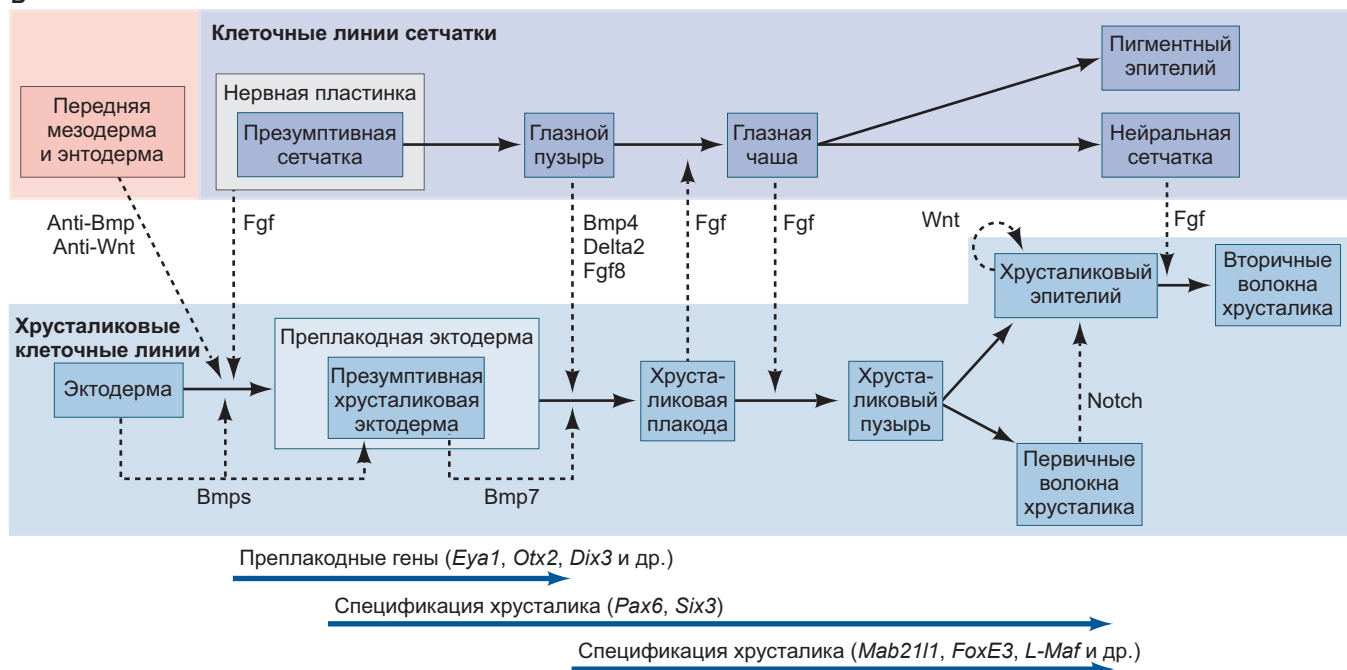


Рис. 16.11. Реципрокные (двусторонние) эмбриональные взаимодействия между развивающейся хрусталиковой плакодой и глазным пузырем мозга. **А.** Основные анатомические изменения от гаструляции и до завершения морфогенеза хрусталика. Эти взаимодействия начинаются с общей преплагодной области, включая хрусталиковую эктодерму, в процессе ее детерминации как таковой, под влиянием нервной пластинки, сердечной мезодермы и глоточной мезодермы. Затем глазной пузырь (выпячивание промежуточного мозга) касается презумптивной хрусталиковой мезодермы, физически преграждая путь проникновению тормозящих развитие хрусталика сигналов из нервного гребня в хрусталиковую эктодерму и запуская серию взаимодействий: преобразует глазной пузырь в двуслойный глазной бокал, внутренний слой глазного бокала — в нейральную сетчатку, вызывает инволюцию хрусталиковой плагоды и ее развитие в хрусталиковый пузырь. Увеличенный участок (справа вверху) показывает ключевые взаимодействия между глазным пузырем и презумптивными хрусталиковыми клетками хрусталиковой плагоды. **Б.** Некоторые из паракринных факторов, принимающих участие в развитии хрусталика. На отдельных стадиях и в определенных тканях Fgf-факторы и их рецепторы могут различаться. Три стрелки внизу показывают некоторые из генов, экспрессирующихся в презумптивном хрусталике в отмеченные периоды развития. (По данным: Н. Ogino et al., 2012. *Dev Biol* 363: 333–347.)

Происхождение эпидермиса

Эпидермис происходит из эктодермальных клеток, покрывающих эмбрион после нейруляции. Как подробно описано в гл. 13, поверхностная эктодерма формирует скорее эпидермис, чем нервную ткань, в результате активности *Wnt*-факторов. Они обеспечивают эпидермальную спецификацию, одновременно индуцируют транскрипционные факторы, блокирующие нейральный путь развития (Bakkers et al., 2002). Мы вновь видим, что спецификация одной ткани связана с блокадой спецификации другой ткани.

Эпидермис возникает как один клеточный слой, но у большинства позвоночных вскоре становится

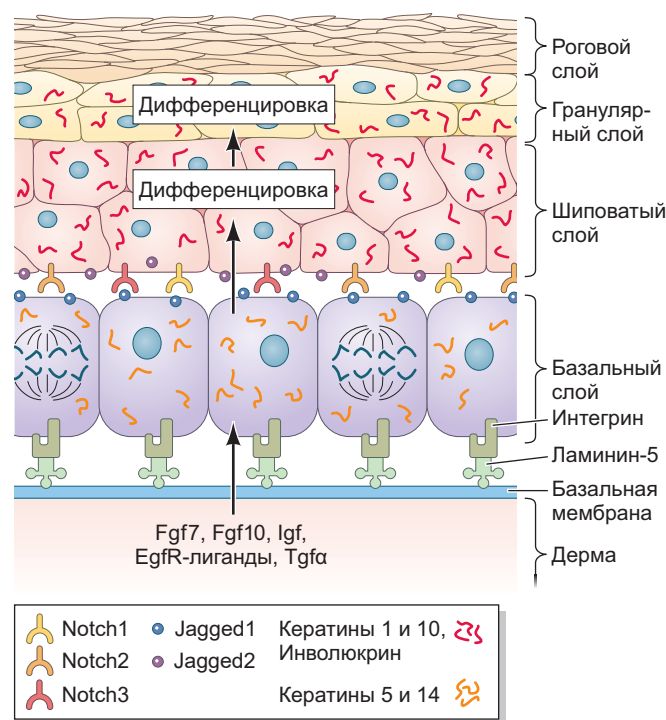


Рис. 16.12. Слои человеческого эпидермиса и сигналы, обеспечивающие постоянное воспроизводство кожи млекопитающих. Базальные клетки митотически активны, тогда как полностью кератинизированные клетки, составляющие внешние слои кожи, мертвы и постоянно слущиваются. Самовоспроизводящиеся стволовые клетки находятся в базальном слое, который интегринами связан с подлежащей базальной мембраной, богатой ламинином, и отделяет эпидермис от подлежащей дермы. Дермальные фибробласты секретируют такие факторы, как Fgf7, Fgf10, Igf, EgfR-лиганды и Tgfa, стимулируя пролиферацию базальных эпидермальных клеток. Делящиеся базальные клетки-предшественники образуют колонны дифференцирующихся клеток с активированным Notch-сигнальным путем, которые проходят три стадии, на каждой производя определенные кератины: шиповатые слои, гранулярные слои и, наконец, мертвые роговые слои, слущивающиеся с поверхности. (По данным: Y. C. Hsu et al., 2014. *Nat Med* 20: 847–856.)

двухслойным. Внешний слой порождает временный покров **перидерму**, сбрасываемый после того как внутренний слой дифференцируется, формируя истинный эпидермис. Внутренний слой, называемый **базальным** или *stratum germinativum*, содержит эпидермальные стволовые клетки, связанные с базальной мембраной, в образовании которой участвуют сами стволовые клетки (рис. 16.12). Как и в случае нейральных стволовых клеток, эту дифференцировку стимулирует сигнальная система Notch (Nguyen et al., 2006; Aguirre et al., 2010). В отсутствие сигналов Notch можно наблюдать гиперпролиферацию делящихся клеток (Ezratty et al., 2011). Сигнал Notch стимулирует синтез свойственных для эпидермиса кератинов и их организацию в плотные промежуточные филаменты (Lechler and Fuchs, 2005; Williams et al., 2011). Есть свидетельства того, что, как и нейральные стволовые клетки эпидермального слоя, эпидермальные стволовые клетки делятся асимметрично. Дочерная клетка, сохраняющая контакт с базальной пластиной, остается стволовой, тогда как другая мигрирует из базального слоя и начинает дифференцироваться. Так или иначе, но оба типа деления — симметричные и асимметричные — играют важную роль в формировании и поддержании эпидермиса (Hsu et al., 2014; Yang et al., 2015). Более того, до сих пор неясно, существует ли дискретная популяция долгоживущих стволовых клеток в базальном слое (Mascré et al., 2012), или все базальные клетки имеют свойства, присущие стволовым клеткам (Clevers, 2015).

Клеточное деление порождает молодые клетки, оттесняя более старые к поверхности кожи. Этот процесс во многом напоминает рождение молодых клеток кишечного эпителия, где они рождаются в кишечной крипте и выталкиваются наружу, на концы ворсинок (см. рис. 5.12), но он не повторяет способ «изнутри наружу» в нервной трубке, где новообразованные нейроны мигрируют сквозь слои более старых клеток к периферии. После синтеза продуктов, характерных для дифференцированной стадии, в клетках останавливается транскрипционная и метаболическая активность. Дифференцированные эпидермальные клетки **кератиноциты** прочно связываются друг с другом и производят водонепроницаемый липидно-белковый слой.

К тому времени, как они достигают поверхности, кератиноциты представляют собой мертвые уплотненные мешки с кератином и их ядра оттесняются на периферию клеток. Эти клетки образуют **роговой слой**, или *stratum corneum*. Вся жизни кератиноциты рогового слоя слущиваются и заменяются новыми клетками¹. В эпидермисе мыши путь из базального

¹ Люди теряют до 1,5 г клеток каждый день. Большая часть этой кожи становится «домашней пылью». Нарушение сигнального пути Notch считают причиной, вызывающей псориаз (Kim et al., 2016).

слоя до сдвигающихся клеток занимает около двух недель. Эпидермис человека обновляется чуть медленнее; пролиферативная способность базального слоя замечательна, так как он поставляет клеточный материал для непрерывной замены $1\text{--}2\text{ м}^2$ эпидермиса каждые 30 дней в течение взрослой жизни.

Эктодермальные придатки

В специфичных сайтах эктодермальный эпидермис и мезенхимная дерма индуктивно взаимодействуют, порождая **эктодермальные придатки**: волосы, чешую, щитки (например, покрывающих панцирь черепахи), зубы, потовые железы, молочные железы или перья, в зависимости от вида и типа мезенхимы. Формирование придатков подразумевает серии реципрокных индуктивных взаимодействий мезенхимы и эктодермального эпителия, приводящих к формированию **эпидермальных плакод**, становящихся предшественниками эпителиев этих структур. Замечательно, что раннее развитие таких разных структур как волосы, зубы и молочные железы, имеет общие черты и управляется реципрокной индукцией с помощью одних и тех же паракринных факторов.

Во всех эктодермальных придатках первым заметным признаком морфогенеза становится локаль-

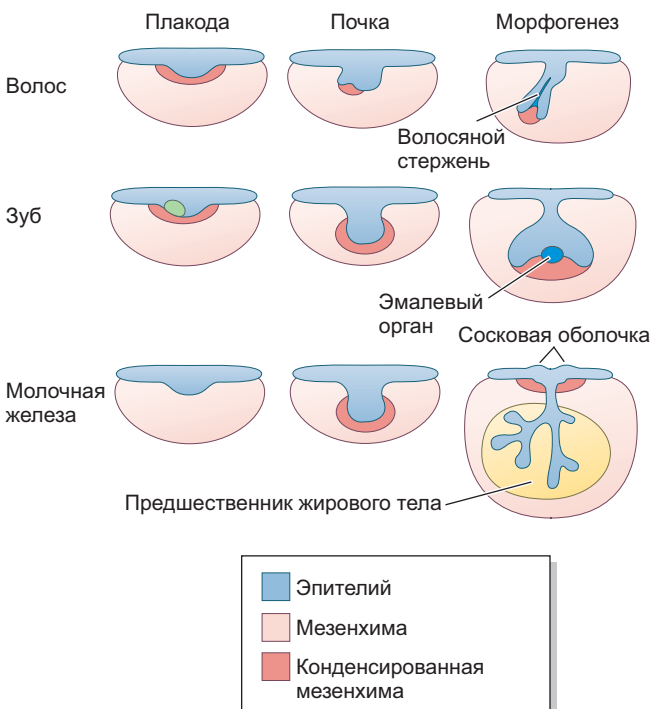


Рис. 16.13. Эктодермальные придатки развиваются, проходя схожие стадии плакод и почек перед дифференцировкой и эпителиальным морфогенезом. Развитие волоса (*верхний ряд*), зуба (*средний*) и молочной железы (*нижний ряд*) показано в трех стадиях. (По данным: L. C. Biggs and M. L. Mikkola, 2014. *Serim Cell Dev Biol* 26: 11–21.)

ное утолщение эпителия, т. е. образование плакоды. Когда мы изучаем развитие млекопитающих, то обнаруживаем, что во множестве участков туловищной и брюшной эктодермы тысячи индивидуальных волосяных плакод закладываются независимо. На каждой челюсти имеется широкое эпидермальное утолщение, известное как **зубная пластинка**, которая (аналогично преплакодной стадии черепных сенсорных плакод) позже образует отдельные плакоды, каждая из которых формирует эмаль своего зуба (см. рис. 16.14). В вентральной эктодерме две молочные складки (или молочные линии) протягиваются от передних до задних конечностей. Мыши обычно имеют пять пар молочных плакод с каждой стороны, каждая из которых становится молочной железой. У людей сохраняется лишь одна пара, хотя иногда третья или четвертая плакода образует дополнительные соски. Молочные плакоды формируются у обоих полов, но полностью развиваются только у самок (Biggs and Mikkola, 2014).

За стадией плакод следует стадия почек, во время которой эктодерма прорастает в мезенхиму. В участках формирования плакод избыточные клетки плакод сжимаются и интеркалируют в сторону общего центра. Происходит впячивание внутрь и движение эпителия в сторону подлежащей мезенхимы. Такие контракционные движения имеют место в развивающихся зубах, молочных и волосяных железах. По мере того как почки взаимодействуют с подлежащей мезенхимой, становятся заметными их различия. Волосной фолликул удлиняется, растет внутрь и обрастает конденсированную индуцирующую мезенхиму. Зубной эпителий схожим образом врастает в мезенхиму и в середине эпителия производит **эмалевый узел**. Это сигнальный центр, контролирующий пролиферацию и дифференцировку окружающих клеток (Jernvall et al., 1988). Эпителий молочной железы прорастает через индуцирующие мезенхимные клетки в развивающуюся жировую подушку, где экстенсивно ветвится (**рис. 16.13**)



Загадки развития

Как формируется птичье перо? Как возникает паттерн распределения перовых плакод?

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Рекомбинационные эксперименты: роль эпителия и мезенхимы

Индукционные взаимодействия эпителия и мезенхимы весьма специфичны. В XX в. путем разделения и рекомбинации эпителиальных и мезенхимных компонентов биологи развития сумели разобраться, какая часть определяет специфичность.

Например, зубной эпителий из 10-дневного эмбриона мыши вызывал формирование зуба в сочетании с незубной челюстной мезенхимой эмбриона той же стадии. К 12-му дню эмбрионального развития, однако, зубной эпителий теряет способность инициировать развитие зуба, тогда как появившаяся конденсированная зубная мезенхима обретает ее (Mina and Kollar, 1987). Экспрессионный паттерн *bmp4* сдвигается от эпителия к мезенхиме вместе с переходом к одонтогенной способности (Vainio et al., 1993). Более того, после перехода эпидермальный участок теряет значение для развития зуба. Зубная мезенхима может вызывать развитие зубов, взаимодействуя с эпидермисом задней конечности (Kollar and Blair, 1970). Обратное сочетание не вызывает развития зубов. У мыши челюстная мезенхима получает способность к формированию зубов в присутствии *Fgf8* и лишается ее в присутствии *Bmp*-факторов (рис. 16.14; Nebüser et al., 1997).

Схожим образом конденсировавшиеся дермальные клетки могут индуцировать образование волосяных фолликулов даже в эпителиях, которые обычно их не несут (таких как эпителий подошв ног) (Kollar, 1970). Эпителий волосяной плакиды не может индуцировать новые волосы. Ранняя мезенхима, но не эпителий молочной железы мыши индуцирует ранние стадии формирования молочной железы в эпидермисе, взятом с головы и шеи (Propper and Gomot, 1967; Kratochwill, 1985). Таким образом, представляется, что в развитии волос, молочных желез и зубов с момента своего формирования конденсированная мезодерма приобретает индукционную способность, детерминирующую

специфичность формирующегося придатка. Интересно, что эта способность индуцировать плакиды отсутствует в мезенхимах некоторых участков, таких как мезенхимы кистей рук, подошв и внешних гениталий. В этих участках экспрессия *NoxA13* представляется активатором синтеза паракринных факторов, которые индуцируют экспрессию специфических кератинов, вместо волос в эктодермальном эпителии (Rinn et al., 2008; Johansson and Headon, 2014).

Сигнальные пути, в которые мы можем вонзить зубы

Почти все основные сигнальные пути вовлечены в формирование эктодермальных придатков (Biggs and Mikkola, 2014; Ahn, 2015). В некоторых случаях, таких как эмалевый узел зубов млекопитающих, один сигнальный центр выделяет паракринные факторы, принадлежащие почти всем семействам (рис. 16.15). Канонический путь *Wnt*/ β -катенина был связан с формированием эктодермальных придатков, поскольку мыши, лишенные компонентов этого пути, не имели полноценно развитой шерсти, зубов и молочных желез (van Gerdeen et al., 1994). Обработка эмбрионов, стимулирующая экспрессию β -катенина во всем эпидермисе, в конечном счете приводит к детерминации всего эпидермиса в направлении образования волосяных фолликулов (Nähri et al., 2008; Zhang et al., 20008) и развитию большего числа зубов в челюсти (Järvinen et al., 2006; Liu et al., 2008). Действительно, *Wnt*-сигнализация может способствовать развитию эмалевых узлов и стать ключевой предпо-

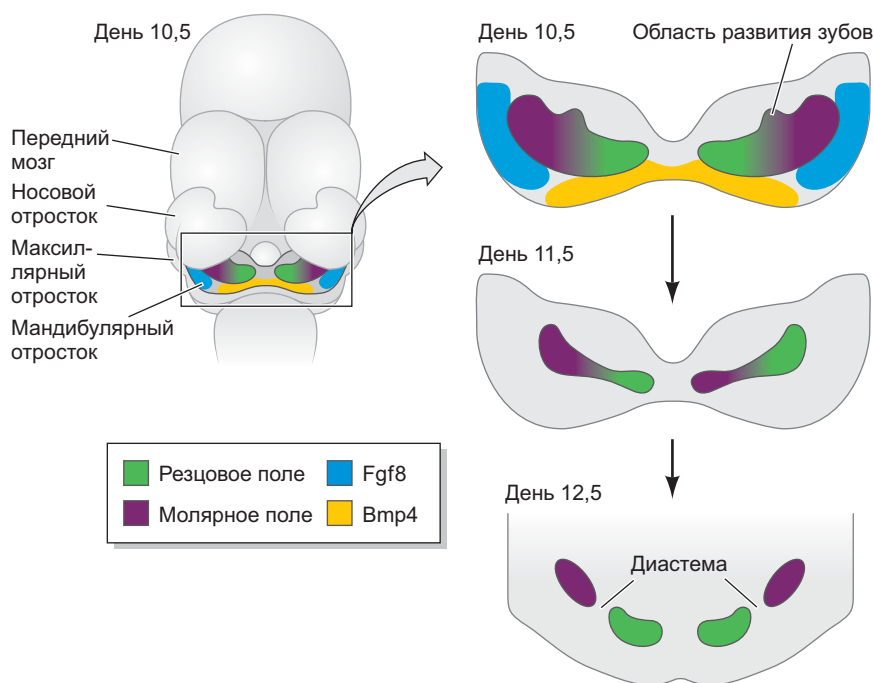


Рис. 16.14. Разделение зубной пластинки на резцовые и молярные поля. Показана нижняя челюсть 10,5-дневного мышиного эмбриона. Считается, что антагонистическое взаимодействие *Bmp4* и *Fgf8* детерминирует зубное поле в эктодерме полости рта. Каждое зубное поле сохраняет непрерывность до 11-го дня развития, но затем делится на резцовые и молярные поля в дистальных и проксимальных частях челюсти соответственно. Два поля разделены участком, лишенным зубов и называемым диастемой. (По данным: Y. Ahn, 2015. *Curr Top Dev Biol* 111: 421–452.)

Загадки развития

Почему у цыплят нет зубов? Можно ли что-то сделать с куриными эмбрионами, чтобы у них появились зубы? Мезенхима зубов происходит из клеток нервного гребня, и в 2003 г. Митсиадис (Mitsiadis) с соавторами создали зубы у куриного эмбриона, пересадив клетки нервного гребня из мышинного эмбриона в куриный. Можете ли вы предложить возможное объяснение того, как эволюционно птицы утратили способность к развитию зубов?

сылкой для приобретения способности регенерации зубов, которая теряется у млекопитающих (Järvinen et al., 2006). Мутантные мыши, лишённые ингибиторов Wnt-сигналикации, развивают большее число и более крупные молочные плакоды (Nähri et al., 2012, Ahn et al., 2013).

Fgf-факторы, вероятно, играют множество ролей в развитии эктодермальных придатков. Одна из них заключается в регуляции миграции мезенхимных клеток, в результате которой они образуют конденсированную мезенхиму под плакодой. В развитии зубов фактор Fgf8 из плакод стимулирует движение мезенхимных клеток в зубную плакоду и удерживает их там (Trunmp et al., 1999; Mammoto et al., 2011). В развитии волос синтезируемый плакодами Wnt активирует секрецию Fgf20, которая может стимулировать миграцию мезенхимных клеток в плакоды (Nuh et al., 2015). Предполагается, что в молочных железах Fgf10 из сомитов (и, возможно, почек конечностей) индуцирует образование плакоды (Mailleux et al., 2002; Veltman et al., 2006). У мышей, лишённых гена *Fgf10* или его рецептора, отсутствуют молочные плакоды 1, 2, 3 и 5. Некоторые члены семейства Tgf- β , в особенности Bmp-факторы, также играют важную роль в развитии эктодермальных придатков. В самом

деле смещение экспрессионного паттерна Bmp4 с эпителия на мезенхиму совпадает с переходом потенциала индуцировать развитие зубов и необходим для перехода от стадии почки к стадии мешочка зубного зачатка. Известно, что Bmp-факторы индуцируют несколько генов, участвующих в развитии зуба (Vainio et al., 1993; Jussila and Tessleff, 2012), а Bmp-факторы с Wnt-белками скорее всего регулируют друг друга, определяя форму зубов (Munne et al., 2009; O'Connel et al., 2012). В то время как экспрессия Bmp необходима для развития зубов, их активность должна быть подавлена для индукции волосных плакод (Jussila and Tessleff, 2012; Sennet and Rendl, 2012).

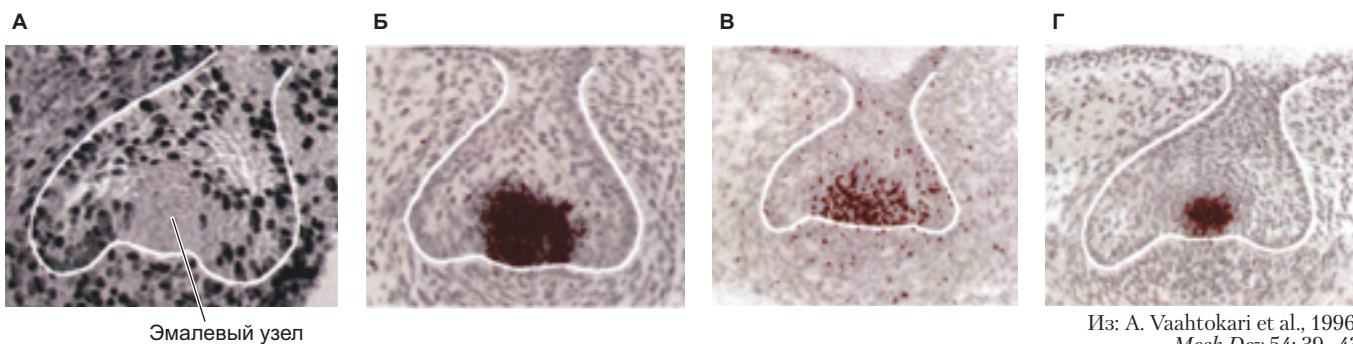
Другие сигнальные пути, такие как пути hedgehog и эктодисплазина, тоже вовлечены в разной степени (Ahn, 2015; Biggs and Mikkola, 2014). Эктодисплазинный сигнальный путь, активирующий транскрипционный фактор NF- κ B, активен во всех кожных придатках. Люди и другие животные с ангидротической эктодермальной дисплазией страдают нарушениями роста волос, зубов и потовых желез (Mikkola, 2015).

Загадки развития

Все щитки черепахи (внешние роговые пластины, покрывающие спину и брюхо) имеют схожий рисунок, вне зависимости от того, морской или сухопутной особи они принадлежат. Тот, кто увлечен математикой, может задаться вопросом: как именно формируются эти узоры?

Стволовые клетки эктодермальных придатков

Обычно эпидермальные придатки продуцируют или поддерживают постнатальные стволовые клетки, которые в особых случаях позволяют возобновить



Из: A. Vaahtokari et al., 1996.
Mech Dev 54: 39–43

Рис. 16.15. Образование зубов у млекопитающих. Эмалевый узел является сигнальным центром, направляющим морфогенез зуба. На фотографиях представлена стадия развития мешочка, где эпителий прорастает в мезенхиму. **А.** Окрашивание радиоактивным BrdU, маркирующим клеточные деления, выявляет участок неделящихся клеток — эмалевый узел. **Б–Г.** Гибридизация *in situ* показывает, что в эмалевом узле транскрибируются гены паракринных факторов, инициирующих несколько сигнальных каскадов. Эти гены включают *Sonic hedgehog* (Б), *Bmp7* (В) и *Fgf4* (Г)

эти структуры. У некоторых видов такие стволовые клетки отсутствуют. Рыбы и рептилии могут регенерировать зубы, но млекопитающие нет. У большинства млекопитающих есть два набора зубов: один у детенышей («молочные» зубы) и постоянный набор у взрослых особей. Оба набора зубов начинают развиваться до рождения. Когда у нас вырастают взрослые зубы, зубная пластинка дегенерирует и мы не можем регенерировать выпавшие или поврежденные зубы. Люди не могут выращивать новые зубы, когда теряют их в пожилом возрасте (имейте в виду, однако, что на протяжении большей части человеческой истории люди умирали, не достигнув сорока лет), другие млекопитающие, включая грызунов и слонов, обладают зубами, которые растут непрерывно (Theskeff and Tummers, 2009). Постоянно растущие мышинные резцы имеют нишу с эпителиальными стволовыми клетками, производящими образующие эмаль амелобласты, а также мезенхимными стволовыми клетками, которые производят

образующие дентин одонтобласты и клетки пульпы (An et al., 2018). У некоторых рептилий, например аллигаторов, часть зубной пластинки сохраняется и содержит эпителиальные стволовые клетки, способные регенерировать потерянные зубы. Когда зубы теряются, β -катенин накапливается в этих клетках, а ингибиторы Wnt теряются (Wu et al., 2013).

Молочная железа, давшая имя нашему классу позвоночных, содержит стволовые клетки для реактивации ее роста в пубертатный период и при беременности (**рис. 16.16A**). В пубертатный период эстрогены вызывают экстенсивное ветвление протоков и удлинение **терминальных концевых почек**. При беременности протоки под влиянием прогестерона и пролактина формируют третичные боковые ветви, которые дифференцируются в производящие молоко альвеолы (Oakes et al., 2006; Sternlicht et al., 2006). Молочная железа млекопитающих, вероятно, содержит стволовые клетки, способные к воспроизводству всех направлений развития железы. Исследования

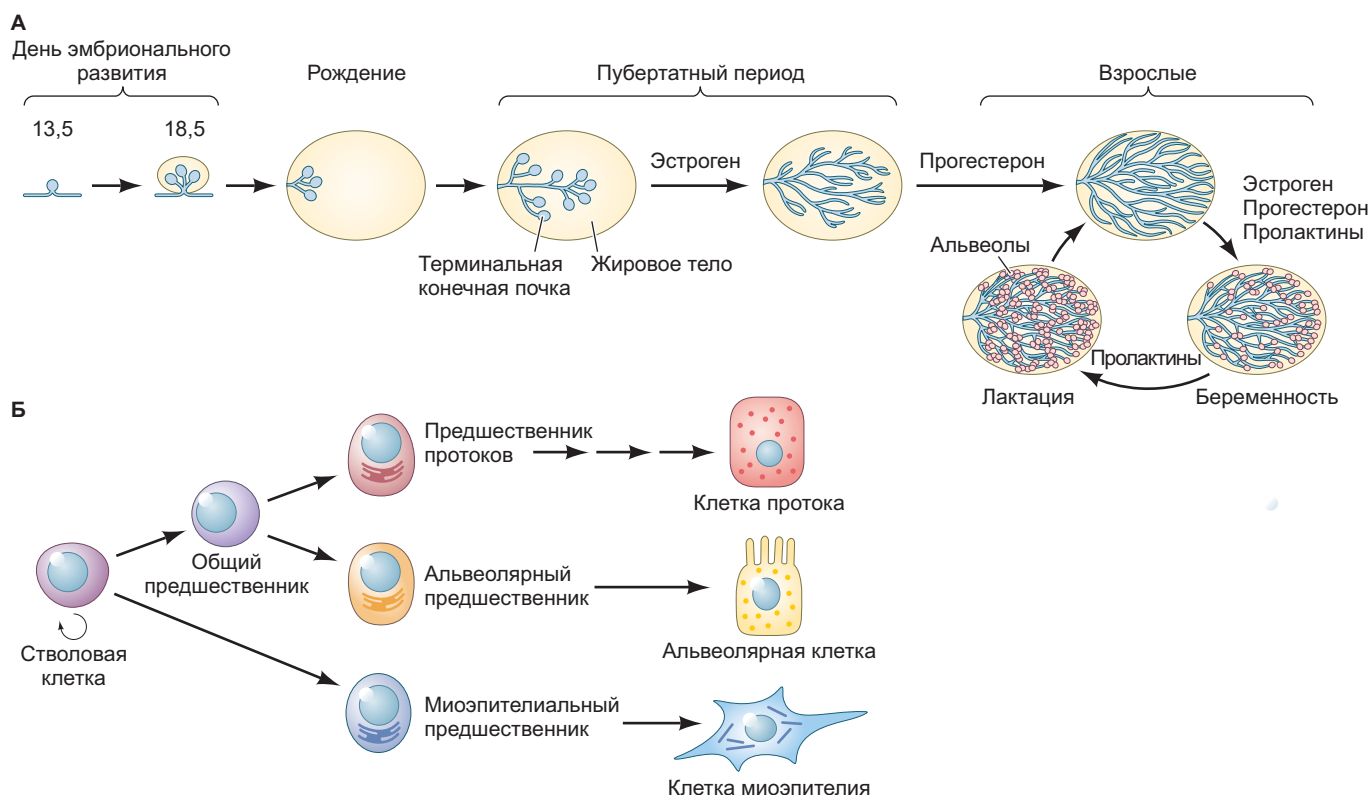


Рис. 16.16. Стволовые клетки и развитие молочной железы. **А.** Стадии развития молочной железы млекопитающих у мыши. Развитие начинается примерно на 11-й день эмбрионального развития. Железа остается на эмбриональной стадии развития до пубертатного периода, когда протоки расширяются. Во время беременности и лактации альвеолы дифференцируются и производят молоко. После беременности альвеолы претерпевают апоптоз, но могут регенерировать во время следующих беременностей. **Б.** Вероятные стволовые клетки и клетки-предшественники (дополнительно к образованию новых стволовых клеток молочной железы). Один из предшественников порождает сокращающиеся миоэпителиальные клетки, выстилающие альвеолы и протоки, тогда как другие клетки-предшественники производят протоки и альвеолы. (По данным: J. E. Visvader and J. Stingl, 2014. *Genes Dev* 28: 1143–1158.)

генетически меченных клеток молочной железы (Rios et al., 2014; Wang et al., 2015) позволяют предположить, что может существовать единственный тип стволовых клеток, который образует два основных типа клеток-предшественников грудных желез: один, производящий протоки и альвеолы, и второй, производящий клетки миоэпителия, которые сокращаются, вытесняя молоко из альвеол к соску (рис. 16.16Б).

Из стволовых клеток эпидермальных придатков лучше всего изучены стволовые клетки волоса. Известны три популяции стволовых клеток, участвующих в образовании эпидермальных структур. Одна, обсуждаемая ранее, находится в зародышевом слое эпидермиса и образует кератиноциты, образующие интерфолликулярный эпидермис. Вторая необходима при формировании сальных желез для каждого волосяного стержня и третья — при формировании самого волосяного стержня. Интересно, что, скорее всего, есть примитивные стволовые клетки, которые образуют все эти группы (Snipperts et al., 2010), и стволовые клетки каждой группы могут переходить во все три группы по мере надобности, как это происходит при регенерации кожи после ранений (Levy et al., 2007; Fuchs and Horsley, 2008).

Волос у млекопитающих представляет собой регенерирующуюся структуру. В течение жизни волосяные фолликулы проходят циклы роста (**анаген**), регрессии (**катаген**), покоя (**телоген**) и повторного роста. Длина волоса определяется временем, которое волосяной фолликул проводит в анагене. У человека волосы скальпа растут несколько лет, а волосы на руках — лишь 6–12 недель в каждом цикле. Способность волосяных фолликулов к регенерации определяет популяция эпителиальных стволовых клеток, образующаяся в постоянном **бугорке** волосяного фолликула в позднем эмбриогенезе. На рисунке человеческого волоса для учебника 1903 г. Филип Штор (Philip Stöhr) изобразил бугорок (Wulst) как место присоединения волосяной мышцы, поднимающей волос и сокращение которой дает эффект «гусиной кожи». Исследования 1990 гг. позволили предположить, что бугорок содержит по крайней мере два типа зрелых стволовых клеток: **стволовые клетки волосяного фолликула** (СКВФ), образующие волосяной стержень и эпителиальное влагалище корня волоса (Cotsarelis et al., 1990; Morris and Potten, 1999; Taylor et al., 2000), и **меланоцитные стволовые клетки**, ответственные за пигментацию кожи и волос (Nishimura et al., 2002). Бугорок представляет собой важную нишу, в которой взрослые клетки сохраняют состояние стволовых. Фолликулярные стволовые клетки бугорка могут регенерировать все эпителиальные типы клеток волоса, и без них новый фолликул не образуется. Но если стволовые клетки селективно уничтожить лазером, определенные клетки эпителия бугорка, обычно не участвующие в росте, заселяют их нишу и могут поддерживать регенерацию волосяного фолликула (Rompolas et al., 2013).



Загадки развития

Люди обладают потовыми железами по всей коже, хотя большинство млекопитающих только на кистях и подошвах стоп. С увеличением размеров мозга увеличивается потребность в эффективной системе охлаждения, чем можно объяснить отсутствие волос на коже с множеством потовых желез. Как могли потовые железы развиться в качестве эволюционной модификации эктодермальных придатков? Что свидетельствует о происхождении потовых желез из волос в результате модификации волосяного фолликула и чем можно объяснить наличие большого числа потовых желез и относительную безволосость нашего тела?

Представляется, что есть две популяции СКВФ: постоянная в бугорке и популяция делящихся клеток прямо под ним. Возможно, кожа как орган вся вовлечена в цикл роста волос (рис. 16.17). СКВФ находятся во внешнем слое бугорка. Внутренний слой образуют их потомки, секретирующие *Vmр6* и *Fgf18* — два репрессора пролиферации СКВФ. К тому же дермальные фибробласты и подкожные жировые клетки выделяют тормозящие рост *Vmр*-факторы. СКВФ активируются в начале анагена сигналами дермального сосочка конденсированной мезенхимы: *Fgf*-факторами и *Wnt*-белками, а также антагонистами *Vmр*-факторов, стимулирующими миграцию эпидермальных стволовых клеток из бугорка. Вне бугорка стволовые клетки производят предшественников, образующих семь концентрично расположенных колонок клеток, из которых состоит наружное корневое влагалище от бугорка к матриксу.

Активацию дермальных сосочков регулирует микроокружение дермиса. Вероятно, подлежащий дермис производит больше *Wnt* и меньше *Vmр*, а предшественники адипоцитов — больше паракринного фактора *Pdgf*, стимулирующего дермальные сосочки (Plikus et al., 2008; Rendl et al., 2008; Hsu and Fuchs, 2012). По мере того как дермальный сосочек удаляется направленным от него ростом эпителиальных клеток, его сигналы перестают достигать стволовых клеток и бугорок возвращается в состояние покоя. Возможно, в позднем анагене простагландин *PGD₂* тормозит продукцию предшественников. В катагене большинство базальных эпителиальных клеток наружного корневое влагалища вступают в апоптоз. При этом верхние фолликулярные клетки сохраняются. Среди клеток наружного корневое влагалища, расположенных ближе к старому бугорку, есть СКВФ. Последние становятся внешним слоем, а те, что ближе к матриксу, дифференцируются, образуя внутренний слой. Апоптоз обеспечивает контакт внешнего слоя с дермальным сосочком, подготавливающим следующий цикл (Hsu et al., 2011; Mesa et al., 2015).

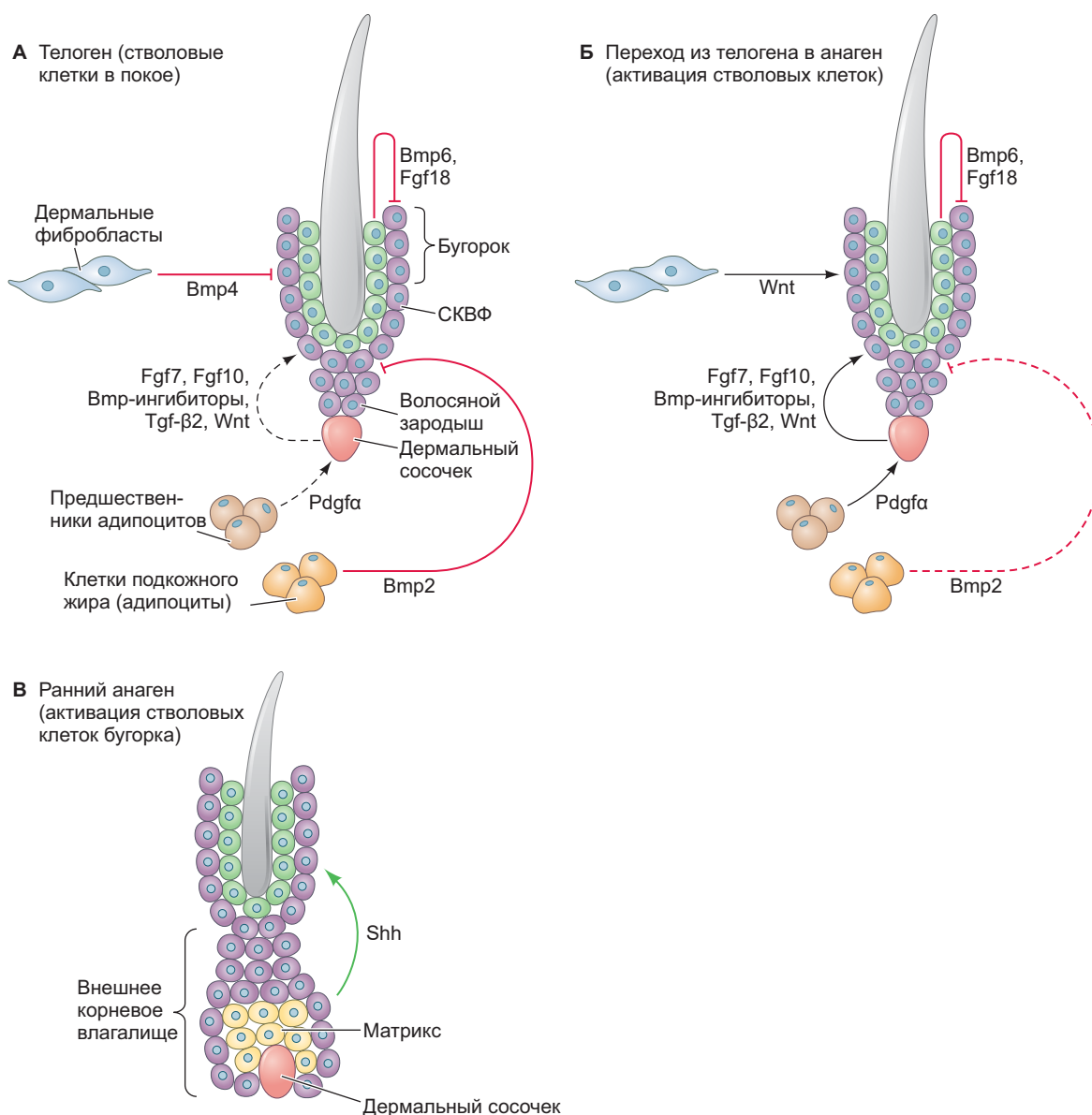
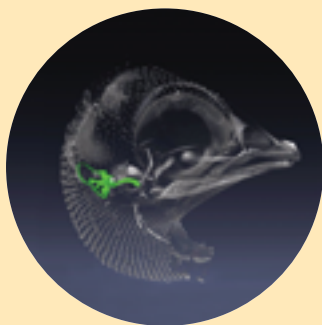


Рис. 16.17. Регенерация волоса стержня стволовыми клетками волосного фолликула (СКВФ) из бугорка волосного фолликула. **А.** В период покоя (телоген) конденсированная мезенхима волосного сосочка контактирует со стволовыми клетками (пурпурный) внешнего слоя бугорка. СКВФ сохраняются в покое в присутствии Bmp6 и Fgf18, происходящих из внутреннего слоя бугорка (зеленый), заселенного потомством СКВФ внешнего слоя, а также за счет других Bmp-факторов, происходящих из дермальной мезодермы (фибробласты; голубой) и жировых клеток (адипоциты; желтый). **Б.** При переходе из телогена в анаген (стадия роста) дермальный сосочек (розовый) индуцируется мезенхимными клетками к производству активаторов роста волоса (Fgf-факторов и Wnt-белков), а также антагонистов Bmp-сигналов. Это вызывает пролиферацию и дифференцировку волосного фолликула. **В.** В анагене контактирующие с дермальным сосочком в основании фолликула клетки быстро делятся, образуя волосной стержень и его канал. Клетки, расположенные вблизи прежнего бугорка, становятся внешним слоем бугорка и имеют стволовые свойства. Внутренний слой толщиной в несколько клеток тоже происходит от СКВФ; этот слой в конечном счете ингибирует пролиферацию СКВФ. В катагене (не показано) большинство клеток вступают в апоптоз, но остающиеся стволовые клетки сохраняются в области бугорка. Затем эпителиальный тяж притягивает дермальный сосочек к области бугорка, и взаимодействие между ними образует зародыш волоса следующего поколения. (По данным: Y. C. HSU and E. Fuchs, 2012. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23: 103–114; Y. C. Hsu et al., 2014. *Nat Med* 20: 847–856.)



Из: A. Kumar et al. 2018.
Birth Defects Research 110:
 1194–1204, с разрешения
 Nobue Itasaki

О фотографии в начале главы

Вы слышали, что внутреннее ухо возникает снаружи? Нобуэ Итазаки выиграл в 2017 г. серебряный приз Анатомического общества за лучшее изображение 10-дневного эмбриона цыпленка, полученное с помощью микрокомпьютерной томографии. Зеленым показаны структуры внутреннего уха, а именно полукружные каналы, вестибулярный аппарат и улитка, а также их расположение в голове эмбриона. В этой главе мы описали, как сложная сеть переменных сигналов взаимодействует с ранней эктодермой, сначала детерминируя направление развития клеток в сторону образования слуховых органов, а затем преобразуя поверхностную эктодерму в плакodu (движение наружу). Последующая дифференцировка слухового пузыря (движение внутрь) — мотив, резонирующий с паттернингом волосковых клеток в улитке.

16

Коротко

Эктодермальные плакоды и эпидермис

1. Эктодермальные плакоды — это участки клеток столбчатой формы. В головном отделе сенсорные плакоды участвуют в образовании органов чувств, формируя обонятельный эпителий, внутреннее ухо и хрусталик глаза, а также образуя черепные сенсорные ганглии. Несенсорные плакоды формируют эпителиальные части волос, зубов, перьев, щитков и чешуй, покрывающих эпидермис.
2. Сенсорные плакоды формируются в полосе эктодермы, окружающей переднюю часть нервной пластинки, называемой преплакодной областью. Сочетание Fgf-сигнализации с подавлением Wnt- и Vmр-сигнальных путей индуцирует этот участок и очищает его от клеток нервного гребня.
3. Преплакодная область после этого разделяется на индивидуальные плакоды. Разделение контролируют локальные сигналы из нервной трубки и подлежащих мезодермы и энтодермы. Например, Fgf-сигнализация стимулирует спецификацию ста-тоакустических предшественников, тогда как Wnt и Vmр определяют раздельную дифференцировку этих двух типов плакод.
4. Слуховой пузырь, формирующий внутреннее ухо, последовательно размечается серией морфогенов, которые картируют расположение различных клеточных типов в растущей улитке.
5. Развитие глаза начинается со спецификации глазного поля в вентральном промежуточном мозге. Рахб играет основную роль в формировании глаза, и репрессия его активности посредством Sonic hedgehog из подлежащей мезодермы разделяет глазное поле таким образом, что два отдельных глазных пузыря вырастают из мозга. Глазные пузыри образуют сетчатку и клетки пигментного эпителия, тогда как хрусталик глаза развивается из хрусталиковой плакоды.
6. Реципрокная (двусторонняя) сигнализация необходима для дифференцировки сетчатки и хрусталика. Клетки, образующие эти органы, имеют две «жизни», так как в эмбриогенезе они строят эти органы, во взрослой жизни служат их составными частями.
7. Базальный слой поверхностной эктодермы становится зародышевым слоем кожи. Эпидермальные стволовые клетки делятся, порождая дифференцированные кератиноциты и следующие стволовые клетки.
8. Эмалевый узел является сигнальным центром, определяющим развитие и форму зуба.
9. Стволовые клетки волосяных фолликулов, которые регенерируют волосяные фолликулы в периоды циклического роста, находятся в бугорке волосяного фолликула.

Параксиальная мезодерма:

сомиты и их производные

Что, когда, где и как много?

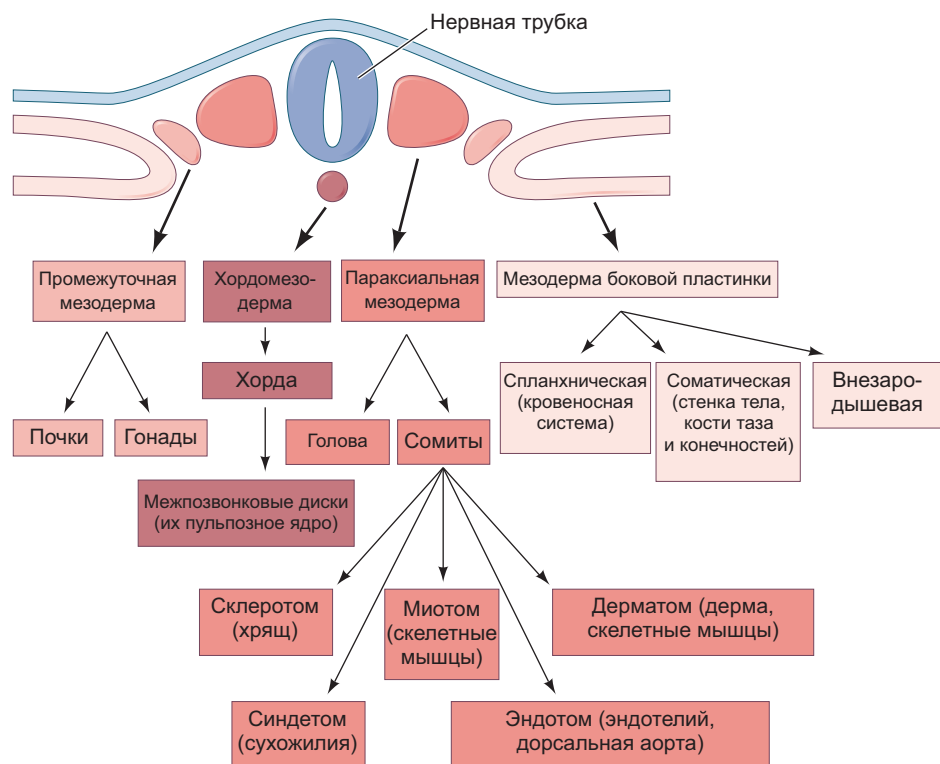


С разрешения: Anne C. Burke

Сегментированный план строения тела очень консервативная анатомическая особенность всех видов позвоночных. Умножение конструктивных элементов посредством сегментации стало механизмом развития, обеспечившим эволюцию все более сложных функций. Например, у людей и жирафов одинаковое число шейных позвонков, но размеры сегментов сильно различаются и адаптированы к условиям окружающей среды. Грудные позвонки — это единственные сегменты, несущие ребра, которые частично обеспечивают защиту органов. Наборы грудных позвонков тоже сильно различаются у человека, мыши и змеи. Число и размер сегментов, а также их производных костей и мышц определяет характер деления мезодермы вдоль передне-задней оси. Как же это происходит в развитии? Как можно разделить ткань на сегменты точного размера? Как у змей может быть порядка 300 пар сегментов, а у людей — всего около 38?

Одна из основных задач гаструляции — создание мезодермального слоя между энтодермой и эктодермой. Образование мезодермальных тканей у позвоночных происходит не после формирования нервной трубки, а одновременно с ним (**рис. 17.1**). Хорда лежит под нервной трубкой вдоль всего тела от задней области переднего мозга до кончика хвоста. По обе стороны от нервной трубки идут толстые полосы мезодермальных клеток, в которых можно выделить параксиальную мезодерму, промежуточную мезодерму и мезодерму боковой пластинки. В ранней параксиальной мезодерме, непосредственно примыкающей к хорде, сомитов нет; эта **пресомитная (несегментированная) мезодерма**, или PSM (известная также как **сегментационная пластинка**), имеет форму билатеральных непрерывных полос мезенхимных клеток. Как было хорошо изучено у амниот, по мере регрессии первичной полосы и сближения нервных валиков

Рис. 17.1. Основные типы мезодермы и их производные у амниот



в центре зародыша клетки пресомитной мезодермы начинают формировать сомиты. Сомиты представляют собой эпителиальные клеточные «блоки», которые с двух сторон примыкают к нервной трубке.

Области туловищной и головной мезодермы и их производные можно кратко описать следующим образом (рис. 17.1).

1. Центральная область мезодермы туловища — **хордомезодерма** (обычно ее называют аксиальной мезодермой). Эта ткань образует временный орган — хорду, основные функции которого включают индукцию и разметку нервной трубки, а также установление передне-задней оси тела. Клетки хорды содержат крупные вакуоли, которые создают сильное гидростатическое давление, придавая этому стержневидному зачатку необходимую жесткость для поддержания формы развивающегося зародыша. Несмотря на то что многие клетки хорды подвергаются апоптозу, желеобразный центр межпозвоночного диска, называемый пульпозным ядром (*nucleus pulposus*), происходит именно из них. (Рис. 17.2; Choi et al., 2008; McCann et al., 2011.)
2. По обе стороны от хорды находится **параксиальная**, или **сомитная, мезодерма**. Ткани, развивающиеся из этой области, будут располагаться на дорсальной стороне зародыша, окружая спинной мозг, а некоторые мышечные производные — еще и в конечностях и на вентральной стороне (в брюшной стенке тела). Прежде чем эти области будут заселены, клетки параксиальной мезодермы сформируют сомиты — временные эпители-

альные блоки мезодермальных клеток по обе стороны от нервной трубки, из которых происходят скелетные мышцы и многие соединительные ткани спины (дерма, мышцы и опорные элементы, такие как позвонки и ребра; рис. 17.2Д, Е). Передняя параксиальная мезодерма не сегментирована; она становится **головной мезодермой**, которая (наряду с нервным гребнем) формирует скелет, мышцы и соединительную ткань лица и черепа.

3. **Промежуточная мезодерма** расположена непосредственно сбоку от параксиальной и образует мочеполовую систему, состоящую из почек, половых желез и связанных с ними протоков. Внешняя (кортикальная) часть надпочечников тоже происходит из этой области (рис. 17.2В).
4. Наиболее отдаленная от хорды **мезодерма боковой пластинки** дает начало сердцу, кровеносным сосудам и кровяным клеткам системы кровообращения, а также выстилке полостей тела. Кроме того, она дает начало скелету конечностей и тазового пояса (но не мышцам конечностей, которые имеют сомитное происхождение). Мезодерма боковой пластинки помогает также сформировать ряд внезародышевых оболочек, которые обеспечивают перенос питательных веществ к зародышу (рис. 17.2Б, В).
5. Спереди от мезодермы туловища расположена головная мезодерма, состоящая из несегментированной параксиальной мезодермы и прехордальной мезодермы. Эта область дает начало головной мезенхиме, из которой формируется большая часть соединительной ткани и мускулатуры головы (Evans,

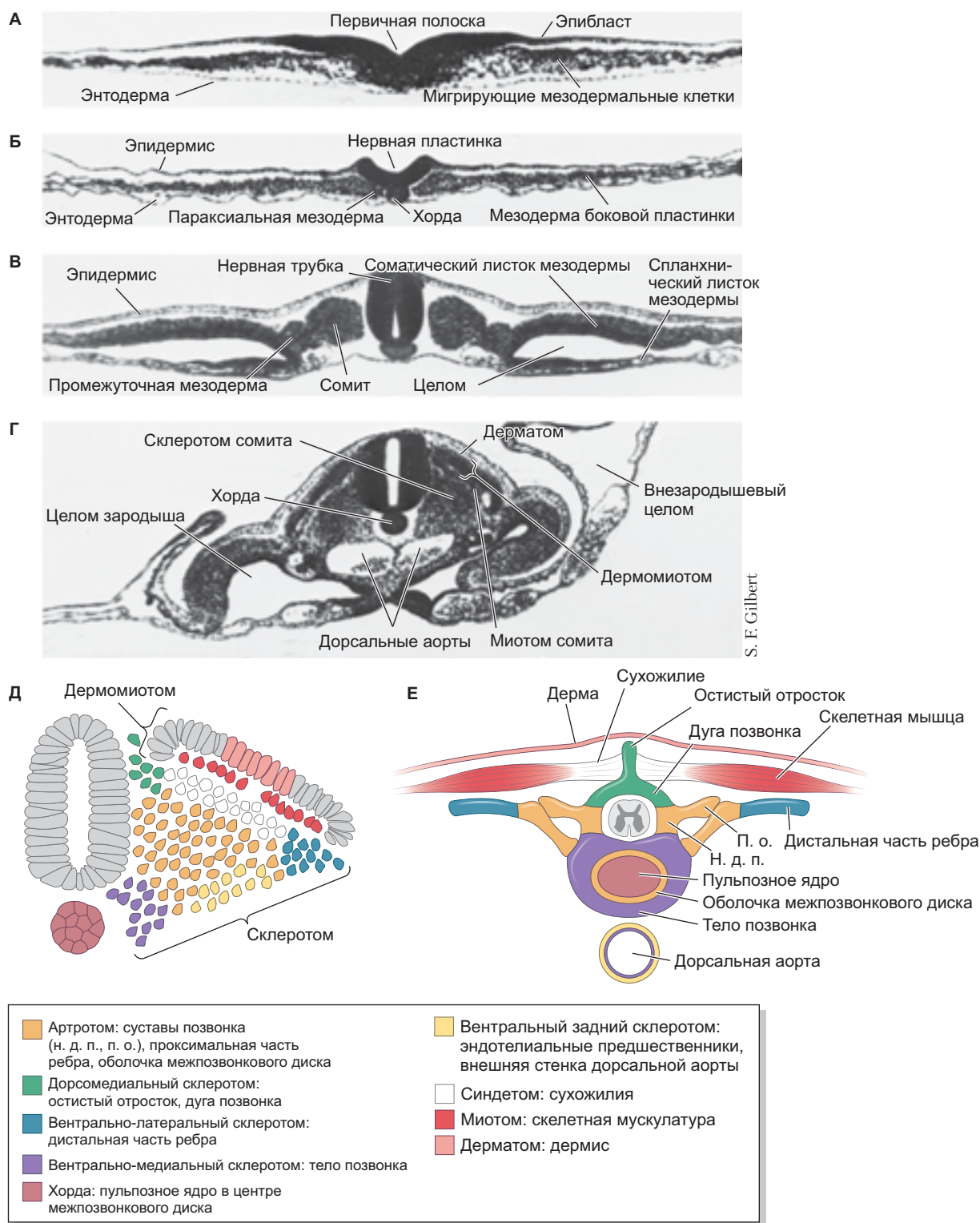


Рис. 17.2. Развитие мезодермы в ходе гаструляции и нейруляции у куриного зародыша: (А–В) первые сутки инкубации, вторые сутки инкубации (Г–Д). **А.** Срез через область первичной полоски, показывающий миграцию мезодермальных и энтодермальных предшественников. **Б.** Формирование хорды и параксиальной мезодермы. **В, Г.** Дифференциация сомитов, целома и двух дорсальных аорт (которые позднее сливаются воедино). Схема строения сомита на поперечном срезе с цветовой кодировкой клеточных линий у двухдневного зародыша (**Д**) и соответствующими производными сомита во взрослом состоянии (**Е**). Серые клетки дермомиотома представляют собой зоны миогенных предшественников (**Д**). Н. д. п. — ножка дуги позвонка (*Pediculus arcus vertebrae*); П. о. — поперечный отросток (*Processus transversus*) (**Е**). (Рис. Д, Е по данным: M. Scaal, 2015. *Semin Cell Dev Biol* 49: 83–91.)

Noden, 2006). Мышцы, происходящие из мезодермы головы, формируются не так, как мышцы из сомитов. Отличаются они не только наличием собственных наборов транскрипционных факторов, но и тем, что подвержены отличным от туловищных типам мышечной дистрофии (Emery, 2002; Bothe, Dietrich, 2006; Harel et al., 2009).

Клеточные типы сомита

Только что сформированный сомит имеет форму блока и состоит из эпителиальных клеток снаружи и мезенхимной массы в центре. Коммитирование клеток сомита в определенные направления дифференцировки происходит относительно поздно, уже после морфогенеза. Сразу после отделения сомита от пресомитной мезодермы все его клетки способны давать любую из производных структур сомита. По мере созревания сомита его домены претерпевают эпителио-мезенхимный переход (ЕМТ), а различные области приобретают способность к формированию только определенных типов клеток (рис. 17.2А–Г). Эти зрелые сомиты содержат два основных отдела: склеротом и дермомиотом (рис. 17.2Г, Д). Склеротом образуется в вентрально-медиальной (ближе всего примыкающей к нервной трубке и хорде) области сомита, где клетки делятся митозом, теряют все эпителиальные характеристики и снова становятся мезенхимными. Дермомиотом происходит из оставшейся эпителиальной части сомита и дает миотом, образующий мышцы, а также дерматом, образующий дерму (рис. 17.2Д, Е).

Склеротом приводит к появлению позвонков со связанными сухожилиями и ребрами (рис. 17.2Д). Соответственно, его можно подразделить на зоны предшественников для определенных клеточных линий. **Синдетом** возникает из более дорсально расположенных клеток склеротома и образует сухожилия, в то время как самые внутренние клетки

склеротома (иногда называемые **артротомом**) превращаются в суставы позвонков, наружную часть межпозвонковых дисков и проксимальный участок ребер (Mittapalli et al., 2005; Christ et al., 2007). Более латерально расположенная мезенхима дает дистальный участок ребер. Клетки вентрально-медиальной области склеротома мигрируют к хорде и образуют тело позвонка, в то время как дополнительные клетки артротомы объединяются с остатками хорды, чтобы сформировать межпозвонковые диски. Дорсомедиальные клетки склеротома образуют остистый отросток и дугу позвонков. Наконец, эндотелиальные клетки-предшественники из задней вентральной области склеротома, которую недавно было предложено называть эндотомом, дают дифференцированные клетки дорсальной аорты и межпозвонковых сосудов (**табл. 17.1**; Pardanaud et al., 1996; Sato et al., 2008; Ohata et al., 2009; Nguyen et al., 2014).

Дермомиотом содержит клетки-предшественники для создания скелетных мышц и дермы спины (рис. 17.2Д). Самый вентральный участок дермомиотома выделяют под названием **миотом**, производными которого становятся мускулатура спины, грудная клетка и брюшная стенка тела. Дополнительные предшественники мышц происходят из латерального края дермомиотома и мигрируют в зачатки конечностей, чтобы сформировать их мускулатуру. Самая дорсальная поверхность дермомиотома развивается в дерматом, из которого происходит дерма спины.

Таким образом, сомит содержит популяцию мультипотентных клеток, чья спецификация коррелирует (и имеет причинную связь) с их местоположением в сомите. Но как именно локализация клеток обуславливает их дифференциацию? Рассмотрим структуры, соседствующие с каждым из регионов-предшественников в сомите. Как они могут влиять на развитие клеток склеротома или дермомиотома? По средней линии лежат хорда и нервная трубка, латеральнее находятся другие мезодермальные производные, и их всех покрывает эпидермис. Далее

ТАБЛИЦА 17.1 Производные сомита

Традиционные представления

Современные представления

ДЕРМОМИОТОМ

Миотом формирует скелетные мышцы.

Боковые участки формируют первичный миотом, из которого развиваются мышцы.

Дерматом формирует дерму спины.

Центральный участок формирует мышцы, мышечные стволовые клетки, дерму, клетки бурого жира.

СКЛЕРОТОМ

Формирует хрящ позвонков и ребер

Формирует хрящ позвонков и ребер.

Дорсальный участок формирует связки (синдетом).

Медиальный участок формирует кровеносные сосуды и мозговые оболочки.

Центральный мезенхимный участок формирует суставы (артротом).

Формирует гладкомышечные клетки дорсальной аорты

в этой главе мы обсудим, каким образом паракринные сигналы от окружающих тканей предопределяют путь развития клеток сомита. Сначала, однако, нам нужно понять, как происходит спецификация параксиальной мезодермы и сомитов.

Определение параксиальной мезодермы и клеточного развития вдоль передне-задней оси

Спецификация параксиальной мезодермы

Распределение мезодермальных компартментов (хордомезодермы, параксиальной, промежуточной и латеральной мезодермы) вдоль медиолатеральной оси (направленной от срединной линии к бокам тела) происходит под влиянием возрастающей концентрации молекул BMP (рис. 17.3А; Pourquie et al., 1996; Tonegawa et al., 1997). В латеральной мезодерме куриного зародыша BMP4 экспрессируется на более высоком уровне, чем в срединных областях, так что в эксперименте можно изменить идентичность мезодермальной ткани, меняя экспрессию BMP. Один из механизмов установления градиента BMP — использование Noggin (ингибитора BMP), который экспрессируется сначала в хорде, а затем в сомитной мезодерме (Tonegawa and Takahashi, 1998). Если клетки, экспрессирующие Noggin, помещают в презумптивную мезодерму боковой пластинки, эта ткань будет дифференцироваться в параксиальную мезодерму, дающую сомиты (рис. 17.3Б; Tonegawa and Takahashi, 1998; Gerhart et al., 2011).

Brachyury (T), Tbx6 и Mesogenin были идентифицированы как пионерные транскрипционные регуляторы ранней спецификации пресомитной мезодермы (Van Eeden et al., 1998; Nikaido et al., 2002; Windner et al., 2012). У *Danio* для развития пресомитной мезодермы необходим как *Tbx6*, так и *Tbx16* (*spade-tail*); однако у мышей *Tbx6*, по-видимому, выполняет функцию обоих этих генов. Потеря *Tbx6* у мыши превращает презумптивную PSM в нервную ткань. У мышей, нокаутных по *Tbx6*, в презумптивной PSM экспрессируется фактор детерминации нейральных предшественников *Sox2* (равно как и другие нейральные гены), что поразительным образом ведет к образованию эктопических нервных трубок на месте PSM (Chapman and Papaioannou, 1998; Takemoto et al., 2011; Nowotschin et al., 2012). Такие зародыши на самом деле имеют три нервные трубки (рис. 17.4)! Эти результаты означают, что *Tbx6* в норме способствует детерминации PSM, частично путем подавления *Sox2* и нейрального развития клеток.

Tbx6 не единственный фактор детерминации PSM. Другой транскрипционный регулятор развития PSM Mesogenin 1 может функционировать, как пионерный фактор транскрипции, воздействуя на *Tbx6* (Yabe and Takada, 2012; Chalamalasetty et al., 2014). Анализ усиления и потери функции мышинового Mesogenin 1 показал, что он является достаточным и необходимым для экспрессии *Tbx6* в PSM (рис. 17.5).

В совокупности эти данные подтверждают поддержание в задней области зародыша популяции бипотентных стволовых клеток, которые сохраняют чрезвычайную пластичность, необходимую для возникновения как мезодермальных, так и эктодермальных клеточных линий (Kimelman and Martin, 2012; Neijts et al., 2014; Beck, 2015; Carron and Shi 2015; Henrique et al. 2015). Хотя транскрипционные

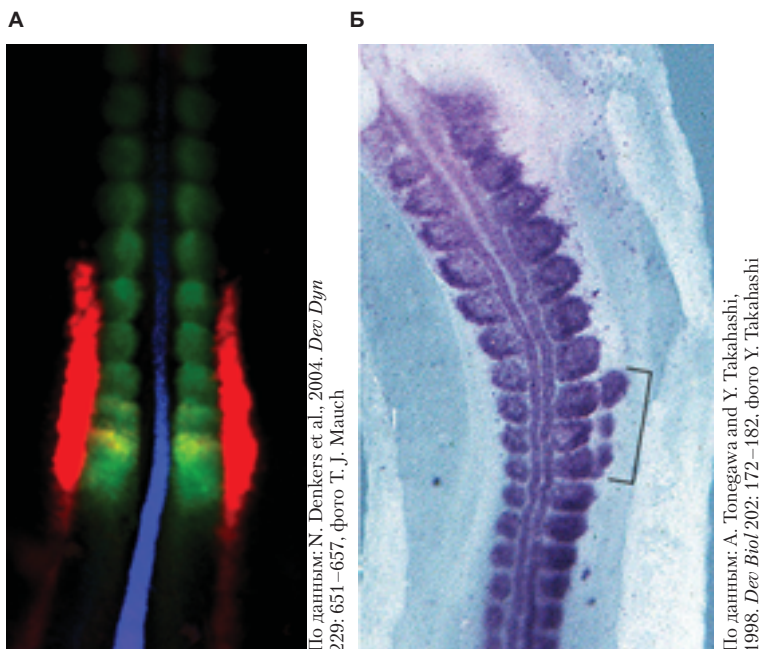


Рис. 17.3. А. Выявление медиальных мезодермальных зачатков в туловище куриного зародыша, стадия 12 пар сомитов (около 33 ч). Гибридизацию *in situ* проводили с помощью зондов, распознающих мРНК *Chordin* (синий) в хорде, мРНК *Paraxis* (зеленый) в сомитах и мРНК *Pax2* (красный) в промежуточной мезодерме. Б. Спецификация сомитов. Подсадка клеток, секретирующих Noggin, в проспективную область мезодермы боковой пластинки курицы переопределяет судьбу этой ткани, так что из нее начинают формироваться сомиты параксиальной мезодермы. Индуцированные сомиты, в том числе эктопические (скобка), были обнаружены путем гибридизации *in situ* с зондом к *Pax3*

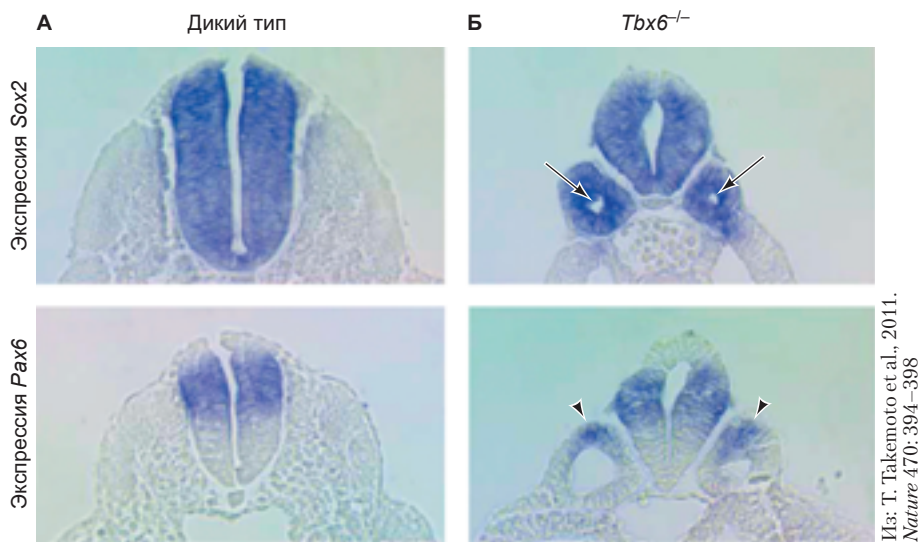


Рис. 17.4. Зародыш с тремя нервными трубками: утрата гена *Tbx6* превращает параксиальную мезодерму в нервные трубки. Выявление экспрессии мРНК (синяя окраска) маркеров нейральной спецификации *Sox2* и *Pax6* у мышей дикого типа (А) и у мышей, нокаутированных по *Tbx6* (Б). У мутантов *Tbx6*^{-/-} ген *Sox2* ectopически экспрессируется во всей презумптивной параксиальной мезодерме, которая приобретает морфологию, свойственную нервной трубке, при этом даже образуется центральный просвет (стрелки). Схожим образом экспрессия маркера дорсальной части нервной трубки *Pax6* указывает на региональную спецификацию клеток в пределах ectopических нервных трубок (концы стрелок)

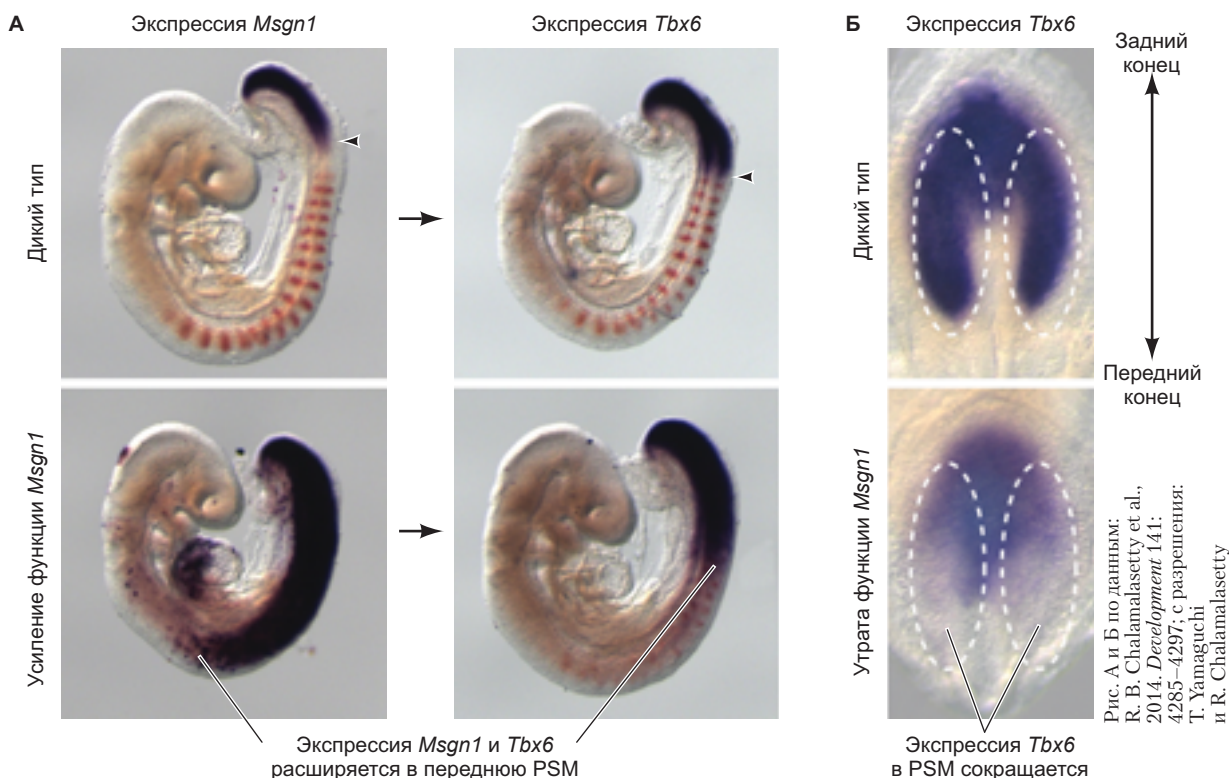


Рис. 17.5. Ген *Mesogenin 1* (*Msgn1*) необходим и достаточен для экспрессии *Tbx6*. А. Усиление функции *Msgn1*. Как показывает гибридизация *in situ*, чрезмерная экспрессия *Msgn1* в пресомитной мезодерме (две нижние фотографии) распространяется по туловищу вперед (слева), что вызывает расширение области экспрессии *Tbx6* (справа). Б. Напротив, утрата функции *Msgn1* приводит к снижению экспрессии *Tbx6* (синий цвет, домены обведены пунктиром). (А — вид сбоку; Б — вид с дорсальной стороны.)

регуляторы этих стволовых клеток уже были упомянуты, немаловажным остается вопрос о сигнальных системах, индуцирующих дифференцировку клеточного материала **каудальной (задней) прогениторной зоны**.

Несколько противоположно направленных морфогенов действуют вдоль передне-задней оси в параксиальной мезодерме. В частности, *Fgf8* и *Wnt3a* экспрессируются на высоком уровне в хвостовой почке позвоночных, в то время как градиент ретиноевой кислоты (RA) распространяется из сомитов и нервной пластинки спереди назад. RA напрямую подавляет экспрессию *Fgf8* и *Tbx6* в достаточной степени, чтобы способствовать определению судьбы нервных клеток посредством активизации *Sox2* (рис. 17.6А; Kumar and Duester, 2014; Cunningham et al., 2015; Garriock et al., 2015). Важно, что *Fgf8* активирует *Cyp26b* (прямой ингибитор синтеза RA), который определяет развитие мезодермальных клеток (рис. 17.6Б). Следовательно, баланс обмена сиг-

налами между этими противоположно направленными и антагонистическими морфогенами управляет клеточной миграцией, пролиферацией и дифференцировкой в соответствующем нейральном или мезодермальном направлении (Cunningham and Duester, 2015; Henrique et al., 2015). Тем не менее эта модель еще должна обеспечивать и формирование различной идентичности сомитов вдоль передне-задней оси.

Пространственно-временная колинеарность экспрессии Нох-генов определяет идентичность структур туловища

Все сомиты могут напоминать друг друга, но они образуют различные структуры вдоль ростокаудальной (передне-задней) оси. Например, сомиты, образующие шейные и поясничные позвонки, не способны

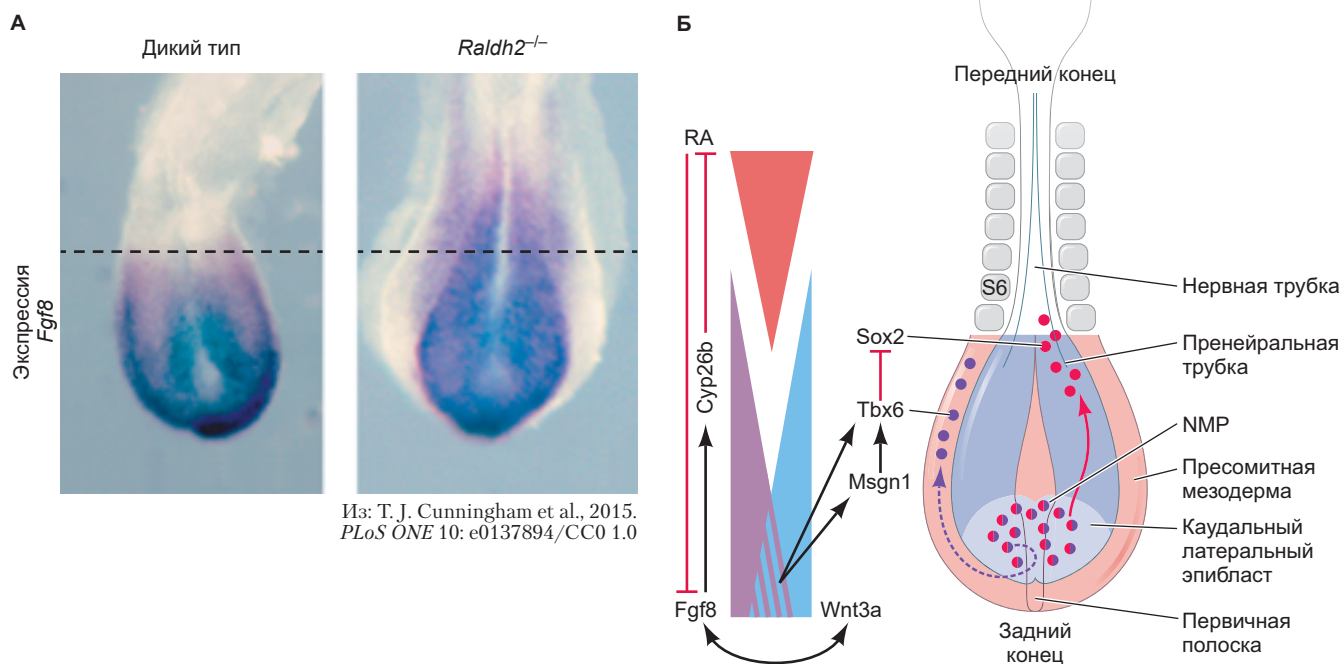
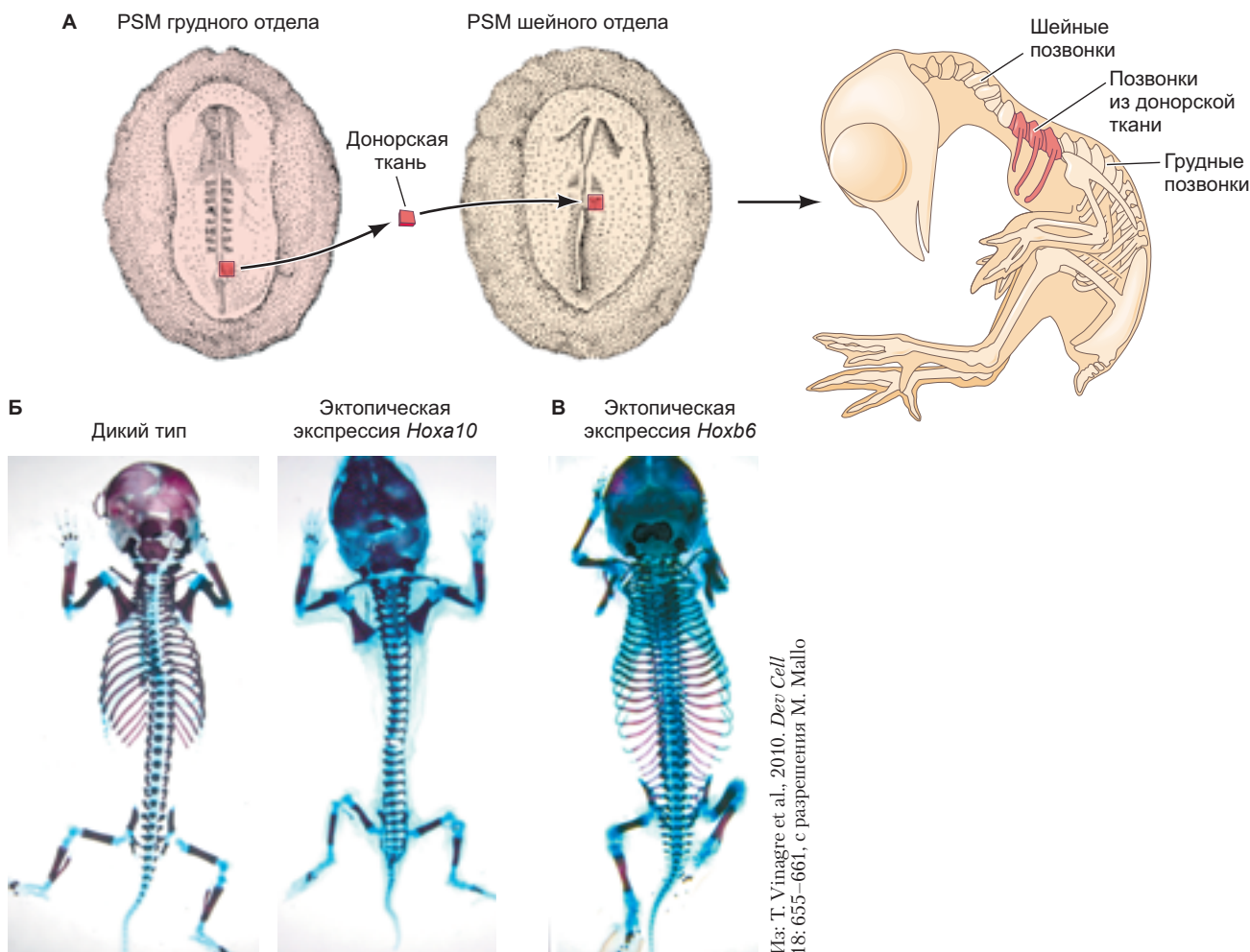


Рис. 17.6. Противодействующие сигналы вдоль передне-задней оси структурируют параксиальную мезодерму и нейромезодермальные предшественники (NMP). **А.** Отсутствие синтеза ретиноевой кислоты у мыши, нокаутированной по *Raldh2*, приводит к расширению экспрессии *Fgf8* вперед (синяя окраска кпереди от пунктирной линии). **Б.** Модель сигнальных взаимодействий, регулирующих поступление NMP клеток из каудальной зоны предшественников (каудальный латеральный эпибласт) в зачаток нервной трубки или пресомитную мезодерму. Задние сигналы FGF и Wnt противодействуют сигналингу ретиноевой кислоты, наиболее активному в передних областях. *Fgf8* и *Wnt3a* усиливают экспрессию *Msn1* и *Tbx6*, что способствует спецификации пресомитных предшественников и подавляет спецификацию нейральных клеток (*Sox2*). (Рис. Б по данным: D. Henrique et al., 2015. *Development* 142: 2864–2875.)

образовывать ребра; ребра формируются только сомитами грудного отдела, причем эта спецификация появляется очень рано в развитии. Детерминация различных областей пресомитной мезодермы обусловлена их положением вдоль передне-задней оси еще до образования сомита. Если пресомитную мезодерму из грудного отдела куриного зародыша пересадить в шейный участок более молодого зародыша, у реципиента на шее со стороны трансплантата появятся ребра (рис. 17.7А; Kieny et al., 1972; Nowicki and Burke, 2000).

Передне-заднюю спецификацию сомитов определяют гены семейства Нох (см. гл. 12). Экспрессия Нох-генов, как правило, колинеарна в пространстве. Так, Нох-гены, расположенные ближе к 3'-концу их кластера в геноме, экспрессируются в более пе-

редних областях параксиальной мезодермы, и наоборот, 5'-концевые гены Нох-кластера экспрессируются в более задних областях зародыша (см. рис. 12.20; Wellik and Capecchi, 2003). При нарушении паттерна экспрессии Нох-генов меняется и спецификация мезодермы. Например, если вся пресомитная мезодерма эктопически экспрессирует *Нох10*, ребра полностью утрачиваются вследствие замены грудных позвонков поясничными (рис 17.7Б). Однако если несвойственную экспрессию *Нохb6* вызвать на всем протяжении PSM, позвонки всех отделов снабжаются ребрами (рис. 17.7В; Sarago et al., 2005; Guerreiro et al., 2013). В обоих случаях трансформация позвоночной идентичности была вызвана эктопической экспрессией в PSM, а не в сомитах. Это означает, что уже клетки PSM получают инструкции для специфи-



По данным: I. Guerreiro et al., 2013.
Proc Natl Acad Sci USA 110: 10682–10686

Из: T. Vinagre et al., 2010. Dev Cell
18: 655–661, с разрешения M. Mallo

Рис. 17.7. Передне-задняя спецификация сомитов. **А.** Если пересадить пресомитную мезодерму (PSM), которая обычно образует грудные сомиты, более молодому эмбриону в область будущего шейного отдела (например, сзади от первого сомита), то трансплантат дифференцируется в соответствии с его исходным положением и образует ребра на шее. **Б.** Как видно из сравнения с эмбрионом дикого типа (слева), избыточная экспрессия *Нохa10* во всей пресомитной мезодерме у мыши ведет к полному отсутствию ребер (справа). **В.** Мышь со «змеиным» фенотипом, при котором ребра есть на каждом позвонке, развивается в случае гиперактивации гена *Нохb6* во всей пресомитной мезодерме. (Рис. А по данным: M. Kieny et al., 1972. Dev Biol 28: 142–161.)

кации осевого уровня, которые затем реализуются во время дифференцировки сомитов. В развитии курицы до миграции клеток через первичную полосу экспрессия Нох-генов может быть изменчивой, но когда клетки параксиальной мезодермы занимают свое положение в пресомитной пластинке, экспрессия Нох стабилизируется. И действительно, после обособления каждый сомит сохраняет свой паттерн экспрессии Нох-генов, даже если этот сомит пересадить в другую область зародыша (Nowicki and Burke, 2000; Iimura and Pourquié, 2006; McGrew et al., 2008).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Нох-гены и их временная колинеарность

Временная колинеарность Нох-генов подразумевает под собой существование механизма контроля над временем активации генов Нох-кластера, который устанавливает пространственную колинеарность их экспрессии вдоль передне-задней оси эмбриона, так что этот порядок экспрессии соответствует геномной организации Нох-генов на хромосоме в направлении от 3'-к 5'-концу. Другими словами, Нох-гены с более ранней экспрессией находятся в клетках, расположенных ближе

к переднему концу эмбриона, и локализованы ближе к 3'-концу хромосомы. Фактически, именно динамическое сопряжение времени активации 3'-к 5'-Нох-генов с времени ингрессии и миграции клеток в параксиальную мезодерму формирует пространственную картину экспрессии Нох вдоль туловища (рис. 17.8А; Izpisua-Belmonte et al., 1991a, b). Изначально, согласно модели зоны прогресса, считали, что прогрессивная активация Нох-генов (от 3'-до 5'-концевых) происходит соответственно в более ранних и поздних клетках PSM (Kondo and Duboule, 1999; Kmita and Duboule 2003). Однако последние исследования на куриных зародышах подтверждают версию, по которой Нох-гены контролируют время ингрессии клеток через первичную полосу; соответственно, клетки, экспрессирующие передние Нох-гены, выселяются из полосы раньше, чем те, которые экспрессируют задние Нох-гены (Iimura and Pourquié, 2006; Denans et al., 2015). В течение этого периода развития параксиальной мезодермы ее ось удлиняется, поскольку новые прогениторные клетки поступают из каудальной прогениторной зоны в PSM, последовательно занимая задние позиции. Таким образом, более передние клетки PSM будут экспрессировать больше 3'-концевых Нох-генов, в то время как поздние

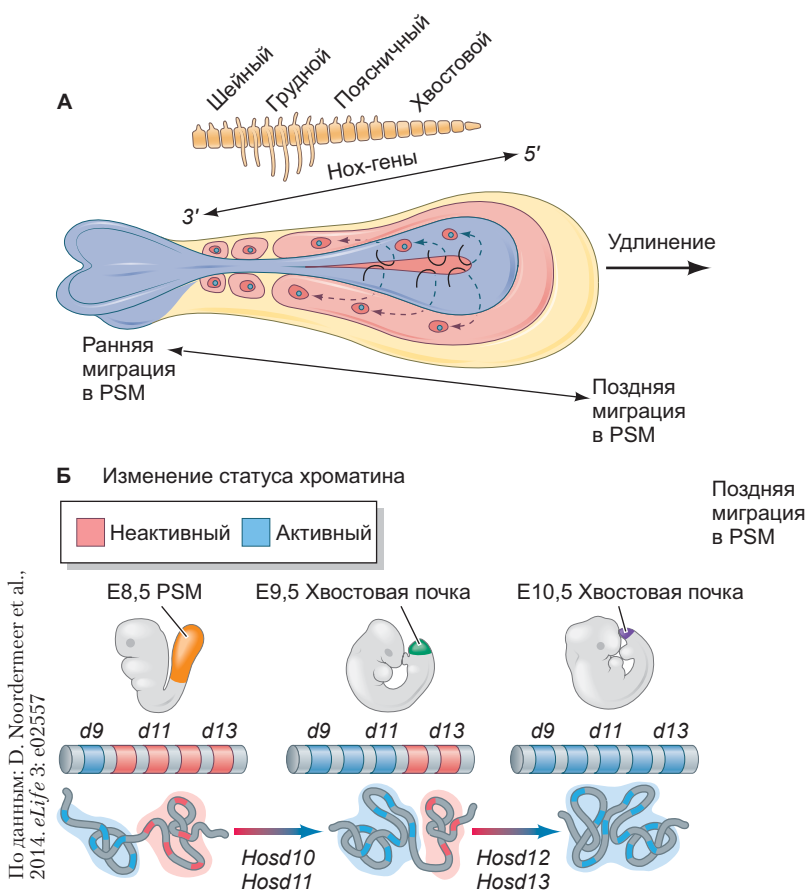


Рис. 17.8. Пространственно-временная колинеарность экспрессии Нох-генов в пресомитной мезодерме (PSM) коррелирует с ремоделированием хроматина. **А.** Последовательная миграция клеток в PSM по мере удлинения хвостовой почки, которая коррелирует с началом экспрессии все более приближенных к 5'-концу кластера Нох-генов и развитием различных отделов осевого скелета. **Б.** Изменения в структуре хроматина прогрессивно обеспечивают доступ для дифференциальной транскрипции Нох-генов в ходе удлинения PSM. Выделенные цветом участки PSM и хвостовой почки использовали для анализа структуры хроматина в локусе *Hoxd* на разных эмбриональных стадиях мыши (E8,5 — E10,5). (Рис. Б по данным: D. Noordermeer et al., 2014. *eLife* 3: e02557.)

образованные клетки PSM будут располагаться сзади и экспрессировать больше 5'-концевых Нох-генов.

В результате все это приводит к формированию окончательной идентичности сомитов вдоль передне-задней оси (см. рис. 17.8А; Casaca et al., 2014). Временная активация Нох-генов была названа Нох-часами (Duboule and Morata, 1994). Как же осуществляется такая линейная активация Нох на клеточном уровне? Исследования показали, что в локусах Нох-генов структура хроматина меняется от плотно упакованной до открытой в хронологическом порядке, который совпадает с порядком их экспрессии в PSM: сначала ДНК 3'-Нох-генов (Hoxd4) демонстрирует признаки неупакованной структуры, затем это происходит с локусами Hoxd8–9, далее с Hoxd10 и, наконец, с наиболее близкими к 5'-концу Hoxd11–12 (рис. 17.8Б; Montavon and Duboule, 2013; Noordermeer et al., 2014). Более того, по всей видимости, как только клетка занимает свое положение в PSM, она начинает поддерживать строго определенное состояние хроматина для своих Нох-генов, так что все ее дочерние клетки тоже сохраняют память об этом состоянии.

❓ Загадки развития

Первые исследования гомеозисных генов у *Drosophila* были проведены Морганом (Morgan, 1915) и Льюисом (Lewis, 1978) очень давно, и можно подумать, что мы уже поняли все о Нох-генах, но множество вопросов, касающихся регуляторных механизмов, все же остаются. Вы уже узнали, что в процессе развития параксиальной мезодермы происходит постепенное разрыхление хроматина от 3'- к 5'-концу Нох-кластеров. Что вызывает эту раннюю эпигенетическую модификацию в хроматине 3'-концевых Нох-генов? Автономно ли происходит последовательная перестройка хроматина всего кластера, или требуются дополнительные регуляторы для продвижения перехода к 5'-концу кластера? Наконец, каковы механизмы, стабилизирующие наследование специфических эпигенетических модификаций Нох-генов в определенной области ДНК? Как видите, осталось еще очень много нерешенных вопросов!

Сомитогенез

Как происходит подразделение пресомитной мезодермы на правильное количество билатерально симметричных сомитов нужного размера? По мере созревания параксиальной мезодермы мезенхимные клетки PSM укладываются в форме завитков, служащих предшественниками сомитов, поэтому их иногда

называют **сомитомерами** (Meier, 1979). Эти предшественники сомитов претерпевают организационные изменения, так что внешние клетки адгезируют друг к другу, образуя эпителий, а внутренние остаются мезенхимными. Первые сомиты появляются сразу за областью слухового пузырька, а новые сомиты «отпочковываются» от роstralного конца PSM через равные промежутки времени (рис. 17.9). Сомитогенезом и называют процесс формирования сомитов за счет периодического создания эпителиальной борозды мезенхимными клетками PSM. Эти медиолатеральные перегородки устанавливают эпителиальную границу между задней половиной последнего сомита и передней поверхностью PSM. Следовательно, цельные сомиты с передними и задними границами не образуются одновременно; если точнее, то одна граница за раз создается через равные промежутки времени. Когда формируется новая граница, она создает заднюю половину сомита (таким образом завершая обособление одного целого сомита), а также устанавливает переднюю половину следующего сомита, который должен быть сформирован.

Чтобы точно обозначить сформировавшиеся сомиты и положение сомитомеров в пресомитной мезодерме, применяют схему нумерации с использованием римских цифр (Pourquié and Tam, 2001). Самый последний сформированный сомит всегда занимает позицию I, а каждый более старый сомит нумеру-



С разрешения: К. W. Tosney

Рис. 17.9. Изображение нервной трубки и сомитов, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа. После удаления покровной эктодермы хорошо видны сформированные сомиты, а также параксиальная мезодерма (красная), которая еще не сегментирована на отдельные сомиты. Округление параксиальной мезодермы, образующей сомитомер (область внутри скобки), видно слева внизу. Клетки нервного гребня мигрируют вентрально из крыши нервной трубки (желтая)

ется в порядке возрастания: II, III, IV и т. д. Для задней области, где сомиты еще не сформировались, позиции будущих сомитов нумеруют в обратном порядке: 0, –I, –II, –III и т. д. Сомитомер 0 (нулевой) имеет общую границу с сомитом I и всегда является следующим сомитом, который будет сформирован.

Поскольку индивидуальные зародыши у любого вида могут развиваться с несколько разными скоростями (например, когда куриные яйца инкубируются при немного различающихся температурах), число выделившихся сомитов обычно служит лучшим показателем биологического возраста. Число сомитов у взрослого индивида видоспецифично. У курицы развивается около 50 пар сомитов, у мышей — 65 пар (многие из них в хвосте), у *Danio* — 33 пары, а у людей обычно от 38 до 45 пар (Müller and O’Rahilly, 1986). У некоторых змей формируется до 500 пар сомитов!

Удлинение оси: каудальная зона предшественников и межтканевая адгезия

По сравнению с большинством других позвоночных, змея однозначно имеет более длинную передне-заднюю ось относительно других осей; таким образом, важным фактором сомитогенеза может быть процесс, посредством которого эта ось удлиняется. Ранее мы уже упоминали о происхождении клеток PSM, передняя область которой возникает во время гастрюляции путем выселения клеток из первичной полоски у амниот или путем конвергенции по средней линии у рыб и амфибий. Однако, как мы обсуждали в этой главе, самая задняя область зародыша содержит популяцию мультипотентных клеток-предшественников, которые могут вносить вклад в формирование как нервной трубки (экспрессирующей *Sox2*), так параксиальной мезодермы (экспрессирующей *Tbx6*); поэтому данные клетки называют **нейромезодермальными предшественниками** или NMP (Tzouanasou et al., 2009). Новые клетки, вступившие на путь мезодермальной спецификации, высвобождаются из этого пула и занимают место на заднем конце тяжелой пресомитной мезодермы.

Хотя механизмы у отдельных видов несколько различаются, выделяют три наиболее значимых фактора, определяющих удлинение оси из каудальной зоны предшественников: *клеточную пролиферацию, миграцию*¹ и *межтканевую адгезию*. Чтобы проиллюстрировать вклад этих трех механизмов, мы рассмотрим их роль в развитии хвостовой почки *Danio*. Хвостовая почка может быть разделена на четыре области, которые отражают различное поведение клеток: дорсальную медиальную зону, зону клеток-предшественников, зону созревания и область, сформированную только что вошедшими в состав

PSM клетками (**рис. 17.10А**). С помощью локализованного в ядре трансгенного репортера удалось проследить направленные движения клеток в хвостовой почке (Lawton et al., 2013). Оказалось, что бипотентные **нейромезодермальные** стволовые клетки находятся в дорсальной медиальной зоне (рис. 17.10А), которая расположена над нервной трубкой, аксиальной и параксиальной мезодермой хвостовой почки (Martin and Kimelman, 2012). NMP-клетки сначала быстро перемещаются в заднем направлении путем **коллективной миграции**² в зону предшественников (на самый кончик хвостовой почки). В зоне предшественников скорость клеток замедляется из-за снижения «когерентности» и сопутствующего перемешивания клеток. Авторы обсуждаемого исследования наглядным образом сравнивают эти явления с потоком транспорта. Если все автомобили движутся в одном и том же направлении, они могут развивать очень высокие скорости, но когда транспортные средства меняют направление, сворачивают с одной полосы движения, встраиваются в другую или даже полностью разворачиваются, это вызывает резкое снижение скорости транспортного потока. Относительно движения NMP-клеток есть мнение, что изменение характера группового поведения может позволить этим клеткам как менять направление, так и запускать синхронизацию траекторий развития. Например, клетки-предшественники поворачивают вперед и мигрируют билатеральными потоками в зоны созревания (лежащие по обе стороны от задней осевой мезодермы) и, наконец, в область PSM (рис. 17.10А).

Когда NMP-клетки мигрируют через зону *созревания*, как и следует из названия, они начинают экспрессировать мезодермальные маркеры (гены *Msn1* и *Tbx6*). Кроме того, эти клетки временно экспрессируют *Cdc25a*, который способствует прохождению *одного* митотического цикла, прежде чем они перейдут в PSM и дифференцируются (Bouldin et al., 2014). Хотя клетки пролиферируют, их *миграция*, по крайней мере в хвостовой почке *Danio*, кажется гораздо более важным фактором, способствующим удлинению оси (McMillen and Holley, 2015).

Как соотносятся рост и сегментация PSM? Неоценимый вклад в понимание этого вопроса внесли

¹ У амниот миграция клеток из каудальной зоны предшественников признана скорее результатом деформации ткани, а не индивидуальным перемещением клеток (Bénazéraf et al., 2010; Bénazéraf and Pourquié, 2013).

² Коллективная миграция основана на том, что самостоятельно перемещающиеся клетки прилагают направленные скоординированные усилия друг к другу, в отличие от индивидуально мигрирующих клеток со свободными контактами или перемещения группы клеток из-за распространения ткани вследствие пролиферации или интеркаляции. Предполагается, что коллективную миграцию используют различные клеточные типы, например клетки нервного гребня и даже метастазирующие раковые клетки.

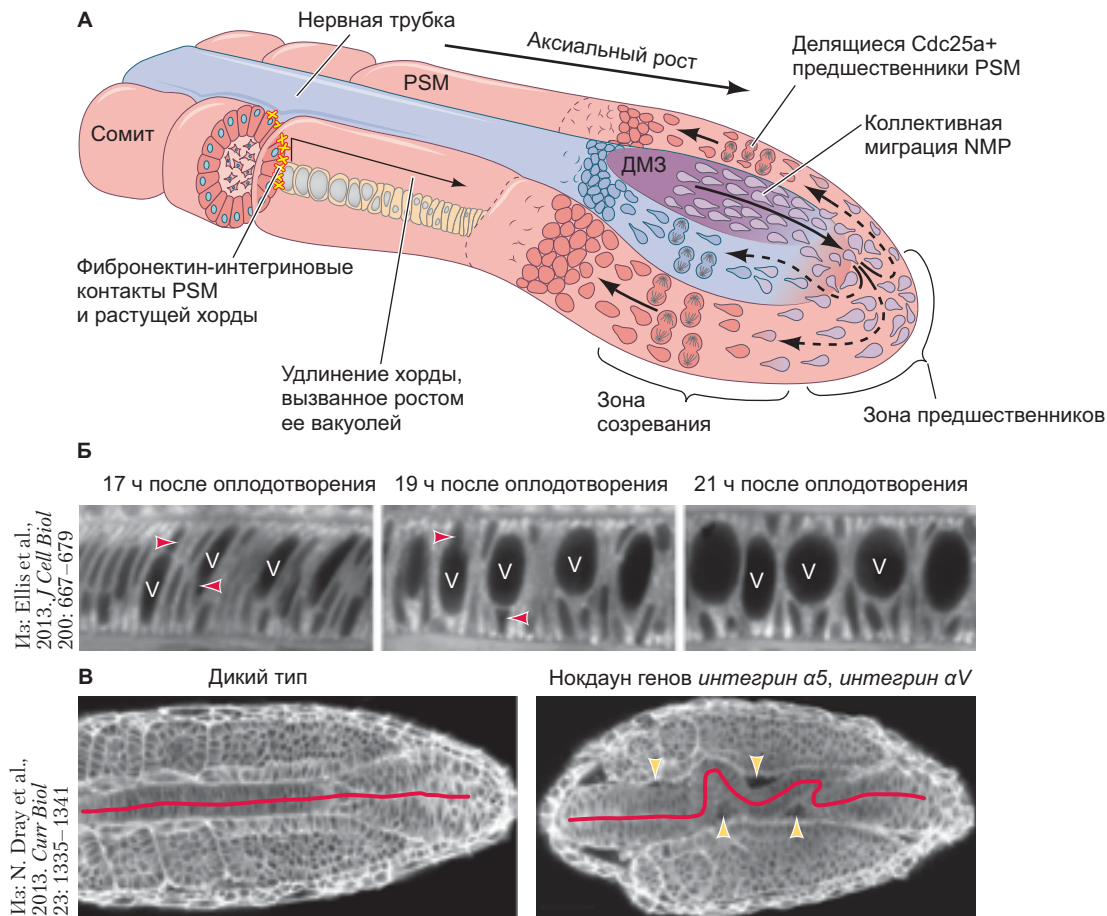


Рис. 17.10. Модель удлинения оси у *Danio*. **А.** Бипотенциальные NMP-клетки из дорсальной медиальной зоны (ДМЗ) коллективно мигрируют в зону предшественников, где они расходятся в двух направлениях: нейральная линия достраивает нервную трубку, а будущая мезодерма билатерально мигрирует к зонам созревания и далее в PSM. Клетки-предшественники в зоне созревания временно экспрессируют Cdc25a, чтобы пройти один митотический цикл. В клетках хордомезодермы разбухают вакуоли, которые оказывают давление на окружающие ткани, при этом сама хорда разрастается в заднем направлении. PSM крепится к хорде благодаря взаимодействию фибронектина и интегрин, что приводит к натяжению позади PSM во время удлинения хорды. Три процесса (миграция клеток, их деление и направляемое хордой смещение PSM к заднему полюсу) и обеспечивают удлинение оси. **Б.** Клетки хорды у эмбрионов *Danio* под большим увеличением (красные концы стрелок указывают на ядра). По мере развития рост вакуолей (V) способствует удлинению хорды. **В.** Двойной морфолиновый нокдаун по *интегрину α5* и *интегрину αV* нарушает адгезию хордовых клеток с внеклеточным матриксом; в результате хорда сгибается при попытке удлинения (красная линия и концы стрелок)

опыты по уменьшению размеров зародышей *Xenopus* и мыши: число образованных сомитов не изменилось, но размер каждого из них был меньше нормального (Tam, 1981). Этот результат свидетельствует о том, что регуляторный механизм контролирует число сомитов независимо от общего размера сегментирующей ткани. Поэтому мы можем уточнить наши вопросы, сформулировав их следующим образом: что управляет эпителизацией клеток PSM для физического создания границы и, как следствие, сомита? Какой механизм определяет положение и время закладки этой границы?

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

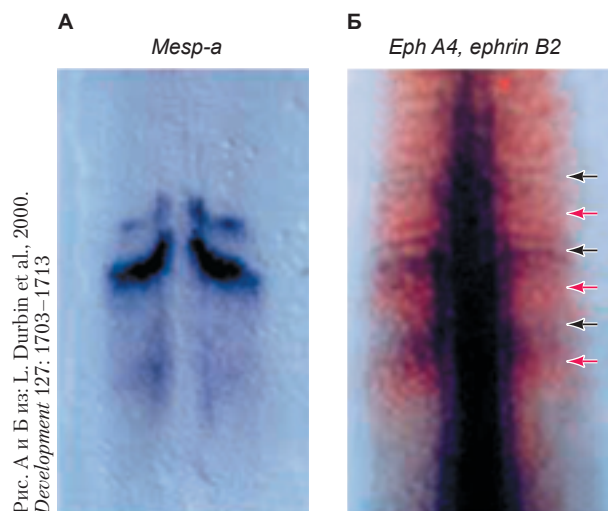
ИСПОЛЬЗУЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЕ ДАВЛЕНИЕ

Помимо миграции и пролиферации клеток, силы межтканевой адгезии тоже участвуют в удлинении передне-задней оси. Главными действующими игроками являются параксиальная мезодерма и прилегающая к ней хорда. По мере созревания NMP-клетки мигрируют в PSM, фибронектиновый матрикс постепенно откладывается на поверхности PSM,

а также на границах между ее сегментами (сомитами и PSM) и хордой (см. рис. 17.10А). В течение периода удлинения оси хордомезодермальные клетки претерпевают значительные изменения, которые приводят к повышению жесткости и направленному вытягиванию хорды (Ellis et al., 2013a). В частности, хордомезодермальные клетки используют эндосомный транспорт для раздувания больших вакуолей (согласитесь, это очень занимательно), что ведет к увеличению размера клеток и оказывает давление на окружающие ткани (рис. 17.10Б). Клетки хорды выделяют также компоненты внеклеточного матрикса (коллаген, ламинин), которые окружают хорду в виде футляра, способного сдерживать расширение от внутреннего давления клеток. В результате организации и усиления давления хорда удлиняется в направлении наименьшего сопротивления — к хвосту (см. рис. 17.10А; Ellis et al., 2013b).

У *Danio* параксиальная мезодерма, по существу, «садится на буксир» к зачатку хорды, используя фибронектиновый матрикс и рецепторы интегрина для механического сопряжения заднего удлинения PSM с вытяжением хорды (рис. 17.10Б; Dray et al., 2013; McMillen and Holley, 2015).

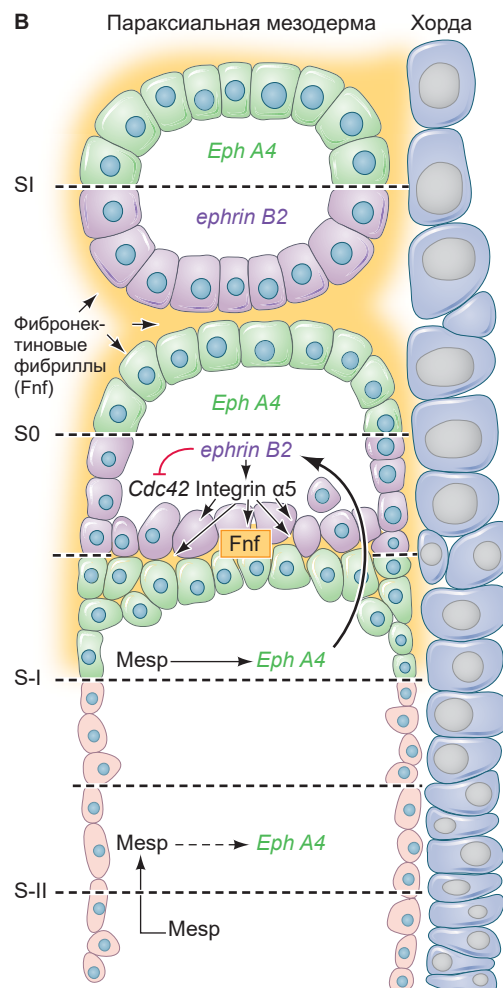
Mesp — активация экспрессии *Eph* именно в передней части сомитомеров (рис. 17.11Б, В). Активность *Eph* на презумптивной передней границе сомитомера (S-I) вызывает активацию его собственных лигандов эфринов в соседней задней половине впереди лежащего сомитомера (S0; рис. 17.11Б, В). Данная цепь событий многократно и последовательно повторяется



КАК СОМИТЫ ПЕРЕХОДЯТ ОТ МЕЗЕНХИМНОЙ К ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ АРХИТЕКТУРЕ

Сомиты имеют организацию эпителиальных блоков, хотя PSM производит только мезенхимные клетки. Следовательно, в развитии параксиальной мезодермы должен иметь место **мезенхимо-эпителиальный переход** (MET). Этот процесс сопровождается повышением уровня экспрессии гена *Mesodermal posterior* (*Mesp*), который кодирует фактор транскрипции, регулирующий запуск MET. Во время обособления сомита лишь его передняя половина сохраняет экспрессию *Mesp* (рис. 17.11А). Основная функция

Рис. 17.11. Сигнальный путь Eph-ephrin регулирует эпителизацию во время формирования границы сомита. Экспрессия гена *Mesodermal posterior-a* (*Mesp-a*; темно-синий) (А), а также *Eph A4* (черные стрелки) и *ephrin B2* (красные стрелки) (Б) в параксиальной мезодерме эмбрионов *Danio* (вид с дорсальной стороны). В. Модель взаимодействия *Mesp* и Eph-ephrin, запускающего MET, в ходе которых возникают клетки границы сомита. *Mesp-a* сохраняет экспрессию и активирует *Eph A4* только в передней половине сомитомера S-I. В свою очередь, *Eph A4* стимулирует своего партнера *ephrin B2* в клетках задней области презумптивного сомитомера S0, что вызывает эпителизацию и формирование границы. Этот результат обеспечивают подконтрольные *ephrin B2* события: репрессию *Cdc42* и активацию контактов интегрина $\alpha 5$ и фибронектина



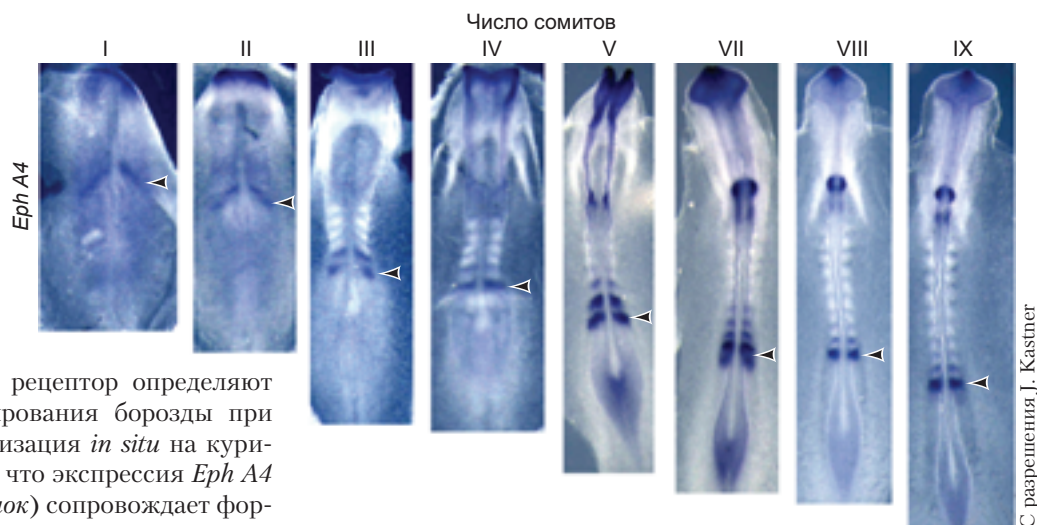


Рис. 17.12. Эфрин и его рецептор определяют место возможного формирования борозды при отделении сомита. Гибридизация *in situ* на курином зародыше показывает, что экспрессия *Eph A4* (темно-синий; концы стрелок) сопровождается формированием каждого нового сомита

в течение всего сомитогенеза (рис. 17.12; Watanabe and Takahashi, 2010; Fagotto et al., 2014; Cayuso et al., 2015; Liang et al., 2015).

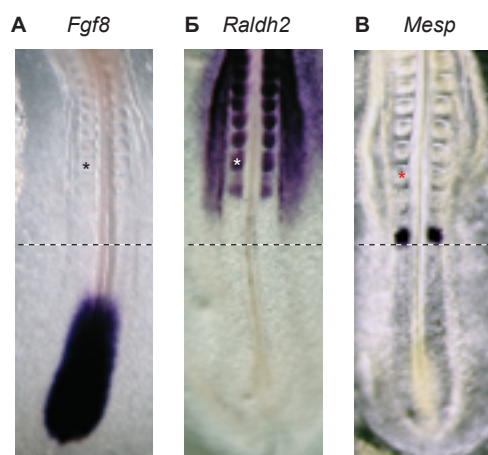
В гл. 15 мы обсуждали, что тирозинкиназные рецепторы Eph и их лиганды эфрины способны вызывать межклеточное отталкивание между задней областью сомита и мигрирующими клетками нервного гребня. Похожим образом отделение сомита от переднего конца пресомитной мезодермы происходит на границе между клетками, экспрессирующими Eph и эфрин (рис. 17.11B; Durbin et al., 1998). Нарушение этого сигнального взаимодействия (например, путем инъектирования эмбрионам мРНК, кодирующей доминантные негативные формы Eph) приводит к образованию аномальных границ сомитов. Более того, у мутантных по *fused somites (tbx6)* рыбок *Danio* отсутствует экспрессия *Eph A4*, а *ephrin B2* активен в параксиальной мезодерме повсеместно, вследствие чего границы сомитов не образуются вовсе (Vargios et al., 2003). Сигнальное взаимодействие Eph A4 с *ephrin B2* приводит к эпителизации сразу после обособления сомита за счет регуляции двух нижестоящих мишеней — ГТФазы Rho и интегрин-фибронектиновых контактов.

Как формируется сомит: модель часов и волнового фронта

Сомиты появляются с обеих сторон эмбриона в одно и то же время. Даже будучи изолированной от остальной части тела, пресомитная мезодерма будет сегментироваться в нужное время и в правильном направлении (Palmeirim et al. 1997). На сегодняшний день преобладающей моделью, которая объясняет синхронность и периодичность сомитогенеза, является модель часов и волнового фронта, предложенная Куком и Зиманом (Cooke and Zeeman, 1976; см. Hubaud and Pourquié, 2014). Согласно этой модели, различают две взаимодействующие системы,

которые регулируют: 1) место возможного формирования границы (волновой фронт) и 2) время, когда должно произойти формирование эпителиальной границы (часовой механизм).

Волновой фронт, который более точно следует называть фронтом детерминации, задается с помощью возрастающего спереди назад градиента активности FGF в PSM, обратного градиенту ретиновой кислоты (возрастающему сзади вперед) (рис. 17.13). FGF-сигналинг поддерживает клетки



Из: O. Pourquié, 2011. Cell 145: 650–663

Рис. 17.13. Сомиты образуются на стыке доменов активности ретиновой кислоты (передняя область) и FGF (задняя область). Звездочками отмечен последний сформированный сомит, пунктирной линией — примерная область границы, на которой происходит окончательное определение территории нового сомита. **А.** Экспрессия *Fgf8* (показано темно-синим) в задней части эмбриона. **Б.** Распределение мРНК гена *Raldh2* (кодирует фермент биосинтеза ретиновой кислоты) в центральной части эмбриона. **В.** Домен экспрессии *Mesp* показывает область, где произойдет образование сомита

PSM в незрелом состоянии; следовательно, клетки в позициях с более низким уровнем активности FGF становятся компетентными к формированию границы. Тем не менее претерпевать эпителизацию (активировать каскад *Mesp–Eph*) действительно будут только те компетентные клетки, которые получают своевременные инструкции для формирования границы. Инструкции о том, когда создавать сегментационную борозду, в значительной степени контролирует осциллирующий наподобие часового механизма сигнальный путь Notch. Каждая осцилляция Notch-Delta синхронизирует группы пресомитных клеток, которые затем (при достижении порогового значения FGF-сигналинга) обособляются в один сегмент (Maroto et al., 2012). У куриного зародыша новый сомит образуется каждые 90 мин. У мышей этот временной интервал более изменчив, но ближе к 2 ч, тогда как у *Danio* период формирования сомитов составляет около 30 мин (Tam, 1981; Kimmel et al., 1995).

ГДЕ ФОРМИРУЕТСЯ ГРАНИЦА СОМИТА: ФРОНТ ДЕТЕРМИНАЦИИ

Вспомните путь дифференциации новорожденной NMP-клетки в хвостовой почке; когда они входят в PSM продольная ось продолжает расти, а в итоге все они окажутся частью сомита. Интересно, что периодически повторяющиеся события вхождения групп клеток в новообразованный сомит обычно происходят на одном и том же расстоянии от хвостовой почки, хотя существуют некоторые исключения. Данный факт свидетельствует о том, что рост хвостовой почки в заднем направлении существенно влияет на место формирования границы. Ранее мы обсуждали роль противоположно направленных вдоль передне-задней оси градиентов RA и Fgf8/Wnt3a в спецификации NMP-клеток (см. рис. 17.6). Этот мощный морфогенетический механизм, называемый *волновым фронтом*, *волной* или *фронтом детерминации*, используется и для влияния на способность клеток PSM стать компетентными к формированию границ (рис. 17.13Б). Мы будем пользоваться термином «фронт детерминации» во всей оставшейся части этой главы, чтобы уменьшить возможную путаницу с осциллирующими волнами экспрессии генов, о которых пойдет речь далее.

Чтобы определить местоположение фронта детерминации в PSM, были выполнены элегантные эксперименты по инверсии сомитов на курином зародыше (рис. 17.14А; Dubrulle et al., 2001). Как мы уже знаем, передне-задняя стратификация развивается в сомитомерах еще до того, как формируются сомиты. Даже после пересадки сомитомера 0 в инвертированном состоянии в нем сохраняется неизменная, предзаданная картина экспрессии генов, которая имеет противоположную передне-заднюю

полярность по сравнению с остальными тканями рецепиента (т. е. эта передняя область PSM уже была «детерминирована»). Однако аналогичные экспериментальные инверсии сомитомеров –III и –VI вызывали соответственно либо варьирующие изменения паттерна («лабильность»), либо полное переопределение полярности («недетерминированность») (рис. 17.14Б–Г). Из этой работы и было определено местонахождение фронта детерминации в сомитомере –IV.

Фронт детерминации находится на переднем крае градиента Fgf8, происходящего из хвостовой почки и узелка первичной полосы. Наиболее интересен способ формирования градиента Fgf8 в PSM. Ген *Fgf8* транскрибируется только в хвостовой почке, но не в клетках PSM (рис. 17.14Д, Е); следовательно, по мере того как кзади растет хвостовая почка, формируется и источник клеток, активно транскрибирующих *Fgf8*. Одним из механизмов, играющих главную роль в формировании градиента Fgf8, является деградация РНК (Dubrulle and Pourquié, 2004). Число транскриптов *Fgf8* в клетке PSM будет постепенно уменьшаться с течением времени из-за распада РНК, что создаст задне-передний градиент активности Fgf8 (рис. 17.14Ж). Таким образом, градиент Fgf8 обеспечивает различные пороговые концентрации по всей PSM. Кроме того, отсутствие транскрипции *Fgf* в PSM поддерживается увеличением концентрации ретиноевой кислоты (функционирующей как репрессор) в сомитах и передней PSM. Каков же клеточный ответ на противоположно действующие морфогены?

Эти и другие результаты (Dubrulle et al., 2001) позволяют предположить, что морфоген Fgf8 служит молекулярным фронтом детерминации для эпителизации и что на уровне сомитомера –IV порог концентрации падает достаточно низко, чтобы позволить клеткам в этом осевом положении стать компетентными к формированию границы. Точнее, на фронте детерминации Fgf8 обеспечивает клетки способностью реагировать на «молекулярные часы», команда которых и срабатывает при создании границы.

КОГДА ФОРМИРУЕТСЯ ГРАНИЦА СОМИТА: ЧАСОВОЙ МЕХАНИЗМ

Чтобы описать механизмы, управляющие периодичностью формирования границ (и сомитов), ученые решили использовать аналогию часов. Как будут выглядеть молекулярные часы у зародыша? Какую продолжительность составляет «период времени» для этих часов? В контексте клетки часы могут быть просто регулярными флуктуациями рабочего и нерабочего состояния белка при условии, что эти изменения активности действительно повторяются и ритмичны по своей природе. Однако в контексте

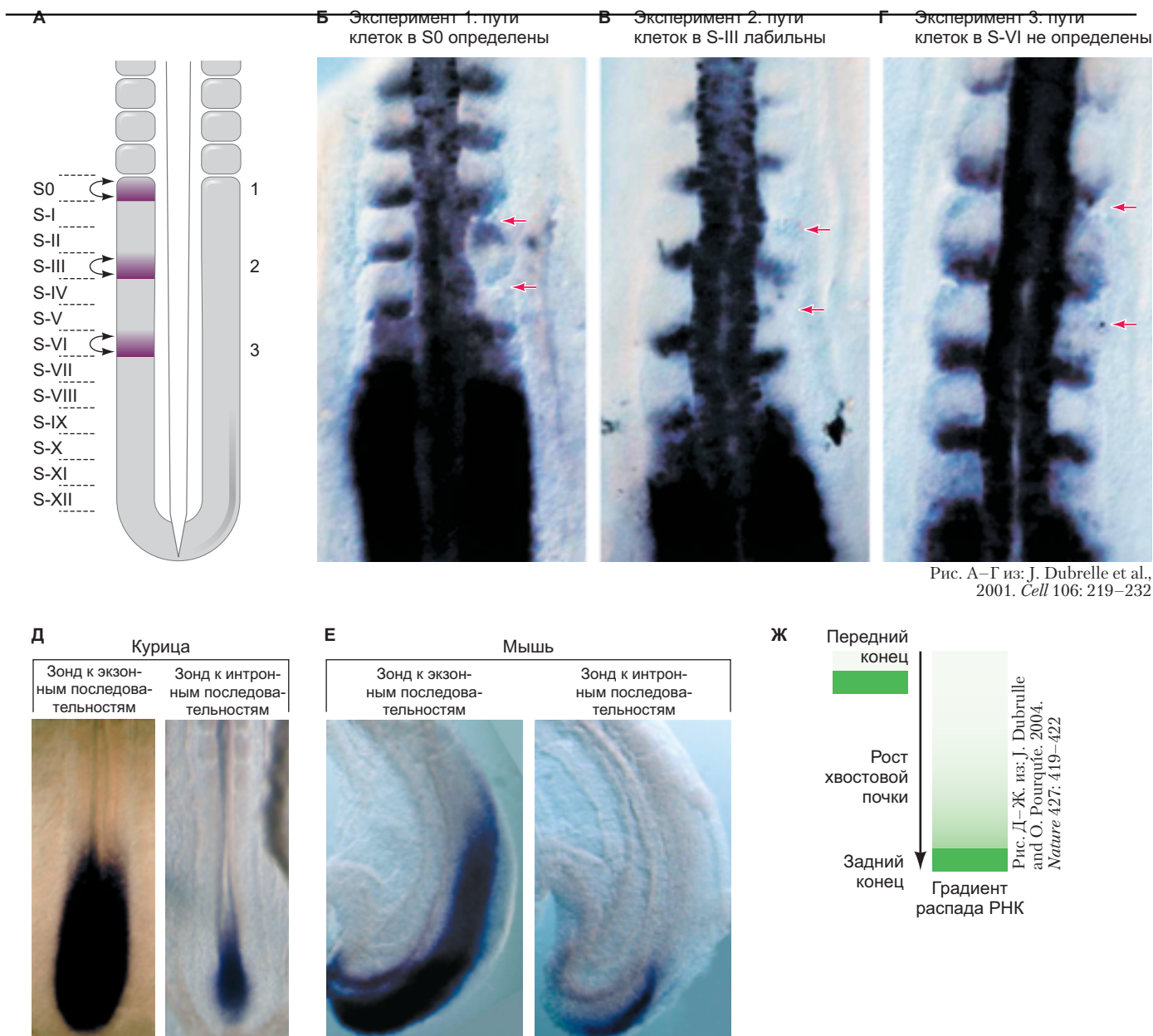


Рис. А–Г из: J. Dubrulle et al., 2001. *Cell* 106: 219–232

Рис. Д–Ж из: J. Dubrulle and O. Pourquie, 2004. *Nature* 427: 419–422

Рис. 17.14. Задний градиент *Fgf8* устанавливает фронт детерминации. **А.** Серия экспериментов по инверсии сомитомеров, в которых пресомитная ткань в трех разных точках (1, 2 и 3) была перевернута вдоль передне-задней оси. **Б–Г.** Экспрессия гена *c-delta1* у куриных зародышей, полученных в экспериментах по схеме (А). На каждом рисунке контрольная сторона тела находится слева, а экспериментальная — справа. Переворачивание сомитомера S0 (Б) показало полное воспроизведение предзаданной позиционной экспрессии *c-delta1*, несмотря на операцию. Следовательно, полярность данного фрагмента уже была определена. Напротив, переворачивание сомитомеров на позициях S-III (В) и S-VI (Г) показало, соответственно, нарушенную экспрессию и нормальную (приуроченную к задней области сомита) экспрессию *c-delta1*. Эти данные свидетельствуют о том, что клетки становятся детерминированными к формированию пограничных территорий на уровне S-IV. Красные стрелки обозначают границы оперированного и инвертированного участка. **Д, Е.** Экспрессия *Fgf8* у курицы и мыши. Зонды для гибридизации *in situ* были комплементарны только экзонным или интронным последовательностям для выявления, соответственно, любой клетки, содержащей мРНК *Fgf8*, или исключительно ядерной РНК (пре-мРНК). Эти результаты демонстрируют два важных свойства градиента *Fgf8*: 1) ген *Fgf8* активно транскрибируется только в хвостовой почке (зонд к интронным последовательностям); 2) градиент *Fgf8* в пресомитной мезодерме устанавливается путем дегградации РНК (**Ж**). Зеленая шкала отражает терминальное заднее положение клеток с активной транскрипцией *Fgf8*, которые по мере удлинения оси постоянно отодвигаются назад. Тянущийся за этой терминальной областью градиент *Fgf8* создается за счет прогрессирующего со временем распада РНК в клетках, которые больше не транскрибируют *Fgf8*

ткани флуктуации белковых часов должны передаваться через клеточные множества. Таким образом, гипотетическая модель для молекулярных часов сомитогенеза позволила утверждать, что активность белка, который регулирует MET на границе сомита, может функционировать в одной клетке PSM и распространить это состояние на соседние клетки посредством межклеточных взаимодействий, пока его работа не будет циклически заблокирована. Таким образом, каждая клетка в ткани может испытывать «включенную» и «выключенную» активность белка или *ход часов*.

Одним из ключевых «часовых» компонентов, поддерживающих темпы сомитогенеза, является сигнальный путь Notch (Wahi et al., 2014). Когда небольшую группу клеток из области задней границы презумптивного сомита трансплантируют в область пресомитной мезодермы, которая в норме не является частью пограничной зоны, межсегментная граница закладывается именно в этом новом месте. Трансплантированные пограничные клетки направляют впереди лежащим клеткам инструкции по эпителизации и разделению. Клетки не из будущей межсегментной области PSM не будут вызывать образование границ при пересадке в такую же непограничную область. Однако эти клетки донора могут приобрести способность индуцировать формирование границ, если в них электропорировать активированный белок Notch. Данные эксперименты показывают, что сигнальный путь Notch может запускать MET, лежащий в основе образования сомита (Sato et al., 2002).

Молекулярные часы сомитогенеза определяют время формирования границ сомитов. Если активность Notch выполняет роль этого хронометра, то он должен демонстрировать ритмические включения и выключения, которые так же способны распространяться по клеткам. В работах по визуализации эндогенного уровня активности Notch в PSM у мыши было показано, что он колеблется в пределах сегментарного паттерна, что коррелирует с формированием границ (Morimoto et al., 2005; Aulehla et al., 2008). Экспрессия часовых генов в PSM подобна волне, так что все клетки, расположенные от заднего до переднего конца PSM, последовательно испытывают сначала повышение активности Notch, а затем понижение. Волна активации Notch останавливается на уровне сомита 0, где и образуется сомитная граница между экспрессирующими Notch клетками, с одной стороны, и неэкспрессирующими Notch — с другой.

Сигнальный путь Notch обеспечивает передачу сигнала от клетки к клетке по всей PSM. Как мы обсуждали в гл. 4, полноразмерный Notch представлен трансмембранным белком, который связывается со своим партнером Delta из соседних клеток. Их взаимодействие вызывает как сопутствующую активацию и повышение в воспринимающих клет-

ках уровня Delta, тоже трансмембранного белка, так и усиление сигнала Notch в индуцирующих клетках. Данный механизм создания паттерна посредством сигналов Notch-Delta известен как **латеральное ингибирование**. Такое сопряжение двух рецепторов обеспечивает передачу сигнала по всей PSM. Можно предположить, что этот механизм основан на мозаичном паттерне экспрессии Notch и Delta на протяжении всей PSM, но это не так. Как и Notch, Delta имеет периодический во времени и пространстве паттерн экспрессии, распространяющийся от заднего к переднему концу PSM, — это ключевая особенность часового механизма. Как это возможно?

Хотя у отдельных видов существуют различия в том, какие именно гены периодически экспрессируются в PSM, у всех позвоночных ход часового механизма сопровождается петлей обратной отрицательной регуляции Notch (Krol et al., 2011; Eckalbar et al., 2012). У всех позвоночных по крайней мере один из генов-мишеней Notch, имеющих динамическую осциллирующую экспрессию в пресомитной мезодерме, тоже способен *ингибировать* активность Notch, что создает петлю отрицательной обратной связи. Эти ингибиторные белки нестабильны, так что после их деградации Notch-сигналинг снова активируется. Обратная связь создает цикл («часы») включения и выключения компонентов Notch за счет отсутствия или присутствия белка, экспрессию которого индуцирует сам Notch. Подобные повторяющиеся включения и выключения имеют все необходимое для обеспечения молекулярной основы периодического обособления сомитов (Holley and Nüsslein-Volhard, 2000; Jiang et al., 2000; Dale et al., 2003). К осциллирующим мишеням Notch относятся *Hairy1*, *Hairy/Enhancer of split-related proteins (Her)* и *Lunatic fringe*; все они активируются Notch, обладают сходным периодическим паттерном экспрессии на всем протяжении PSM от хвостовой почки до последнего сформированного сомита, а также отрицательно регулируют Notch для подавления передачи его сигналов (Chipman and Akam, 2008; Pueyo et al., 2008). Например, ген *Hairy1* был первой мишенью Notch, для которой обнаружили ритмический паттерн экспрессии (**рис. 17.15**). Сначала ген *Hairy1* экспрессируется широким доменом на каудальном полюсе пресомитной мезодермы. Со временем этот домен экспрессии одновременно сужается и перемещается вперед до тех пор, пока не достигнет роstralного конца PSM, после чего на заднем конце начинается новая волна экспрессии. Так, у живых мышинных зародышей наблюдали волны транскрипционной активности *Lunatic fringe*, которые повторяют паттерн экспрессии *Hairy1* (Aulehla et al., 2008). Время, за которое волна экспрессии проходит через всю пресомитную мезодерму, у курицы составляет 90 мин. Отнюдь не совпадение, что ровно с таким же интервалом у этого вида формируются билатераль-

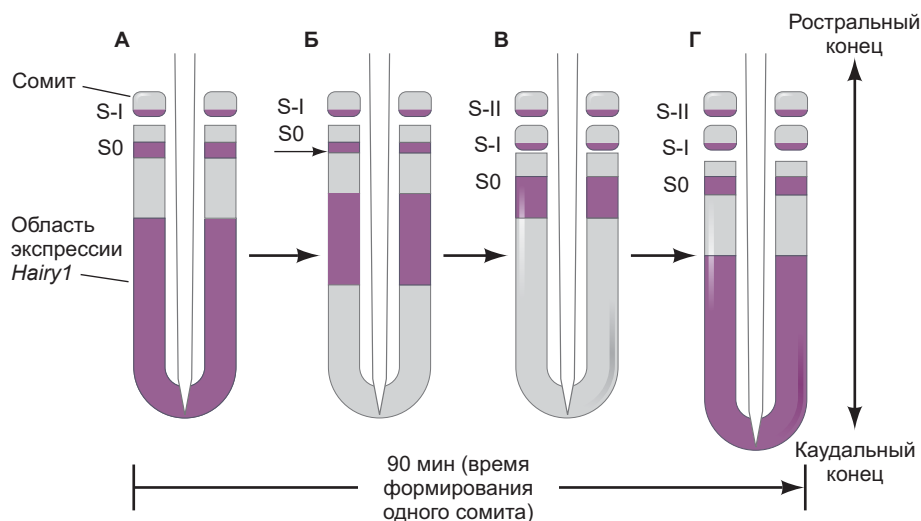


Рис. 17.15. Образование сомитов коррелирует с волнообразной экспрессией гена *Hairy1* у курицы. **А.** На заднем конце куриного зародыша сомит S-I только что отделился от пресомитной мезодермы. Экспрессию гена *Hairy1* (фиолетовая заливка) можно наблюдать в задней половине этого сомита, а также в задней части пресомитной мезодермы и в тонкой полосе клеток, которые сформируют заднюю половину следующего сомита (S0). **Б.** Задняя борозда (маленькая стрелка) начинает отделять новый сомит от пресомитной мезодермы. Задняя часть домена экспрессии *Hairy1* сдвигается вперед. **В.** Вновь образованный сомит, теперь называемый S-I, сохраняет экспрессию *Hairy1* в задней половине. Самая задняя область экспрессии *Hairy1* в PSM продолжает еще больше смещаться вперед, а также укорачиваться. Бывший сомит S-I подвергается дифференциации и называется теперь S-II. **Г.** Формирование нового сомита S-I завершено, следующий цикл экспрессии *Hairy1* начинается сначала. У курицы формирование каждого сомита и волна экспрессии *Hairy1* по PSM продолжаются около 90 мин. (По данным: I. Palmeirim et al., 1997. *Cell* 91 (5): P639–P648.)

ные пары сомитов. Описанная динамика экспрессии обусловлена не движением клеток, а способностью всех клеток включать и выключать транскрипцию генов в различных областях ткани за счет петли отрицательной обратной связи (Johnston et al., 1997; Palmeirim et al., 1997; Jouve et al. 2000, 2002; Dale et al., 2003). Поэтому неудивительно, что потеря функции Notch или его нижестоящих осциллирующих генов-мишеней у мышей и людей приводит к серьезным дефектам сегментации, таким как деформация позвоночника при сколиозе и спондило-костальном дизостозе (рис. 17.16; Zhang et al., 2002; Sparrow et al., 2006).

ЗАВЕРШЕНИЕ ОСЦИЛЛЯЦИЙ NOTCH ЭПИТЕЛИАЛИЗАЦИЕЙ

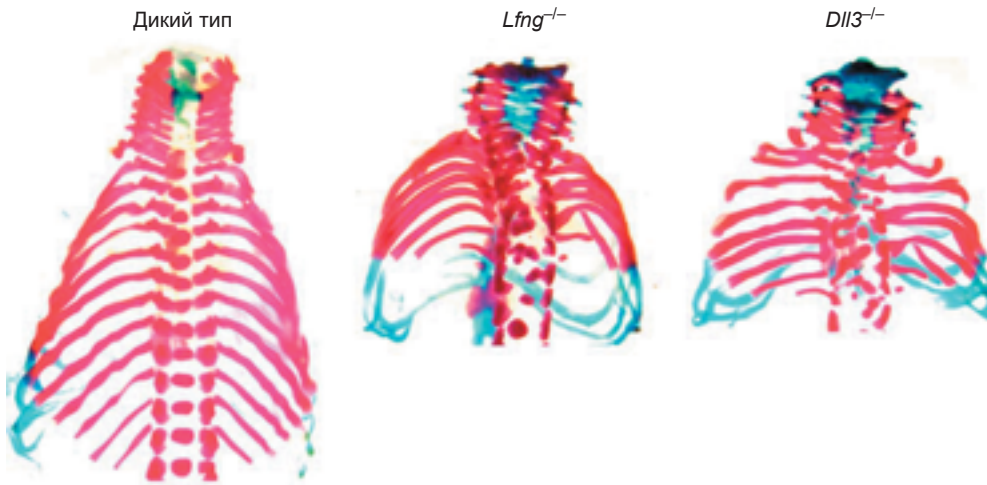
Как мы обсуждали ранее, *Mesp* является глобальным регулятором каскада Eph-ephrin, который запускает MET и формирование границ. Активация *Mesp* происходит за счет сигнала Notch, а сам *Mesp*, будучи транскрипционным фактором, способствует подавлению Notch (Morimoto et al., 2005). Описанный выше цикл попеременной активации и подавления часовых генов вызывает колебание экспрессии

Mesp во времени и в пространстве. Первоначально экспрессия *Mesp* охватывает территорию всего сомита; затем происходит репрессия *Mesp* в задней половине этого домена, но экспрессия сохраняется в передней половине, где он, в свою очередь, подавляет активность Notch. Где бы ни сохранялась экспрессия *Mesp*, эта территория становится передней частью следующего сомита; именно в ней *Mesp* индуцирует Eph A4 и межсегментная борозда формируется непосредственно впереди от этих клеток (см. рис. 17.11B; Saga et al., 1997). В задней половине презумптивного сомита, где *Mesp* не экспрессируется, активность Notch индуцирует экспрессию транскрипционного фактора *Unsx4.1*, который вносит свой вклад в спецификацию задней области сомита (Takahashi et al., 2000; Saga, 2007). Таким образом одновременно создается и граница сомита, и его передне-задняя полярность.

В НУЖНОМ МЕСТЕ В НУЖНОЕ ВРЕМЯ: СОПРЯЖЕНИЕ ЧАСОВ И ФРОНТА ДЕТЕРМИНАЦИИ

Расположенные у заднего конца PSM-клетки испытывают волны активности Notch, но преждевременно не эпителизируются, поскольку из-за влияния

А Мышь



Из: R. E. Fisher et al., 2012.
Anat Rec (Hoboken) 295: 32–39

Б Человек

Миссенс-мутация С>А в гене *Lfng* (неактивный фермент)



Из: D. B. Sparrow et al., 2006. Am J Hum Genet 78: 28–37

Рис. 17.16. Сигнальный путь Notch-Delta необходим для правильного сомитогенеза и у мышей, и у людей. У мыши потеря мишени Notch — гена *Lunatic fringe* (*Lfng*) либо связывающегося с ним партнера *Distal-less-3* (*Dll3*) приводит к тяжелым порокам развития позвоночника (А), которые особенно похожи на фенотип, вызванный мутациями *LUNATIC FRINGE*, известными у человека (Б)

FGF не компетентны эффективно отвечать на сигнал Notch. Пока пресомитная мезенхима находится под влиянием относительно высокой концентрации Fgf8, часовый механизм не функционирует. По крайней мере, у *Danio* отсутствие функции, скорее всего, связано с репрессией Delta — основного лиганда Notch. Связывание Fgf8 его рецептором запускает экспрессию белка Her13.2, который необходим для подавления транскрипции Delta (Dequéant and Pourquié, 2008). Сигналы FGF необходимы для обеспечения миграции клеток из хвостовой почки в переднем направлении, но пока FGF активируют белки ERK, клетки остаются невосприимчивыми к сигналу Notch. Предполагается, что синтез Fgf8 тоже цикличен, но имеет другую частоту, чем у компонентов Notch (Niwa et al., 2011; Pourquié, 2011). Благодаря комбинации градиента концентрации Fgf8 и его собственного уникального паттерна осцилляции (возможно, путем синтеза собственных ингибиторов и подавления ретиноевой кислотой) путь FGF инактивируется в определенных областях параксиальной мезодермы, где клетки становятся все более компетентными реагировать на сигналы Notch (рис. 17.17; Hubaud and Pourquié, 2014). Следовательно, FGF задает *нужное место* (т. е. фронт детерминации), где клетки способны отвечать на периодические сигналы Notch (т. е. часы), необходимые для индукции MET, что в итоге приводит к образованию сомитов¹.

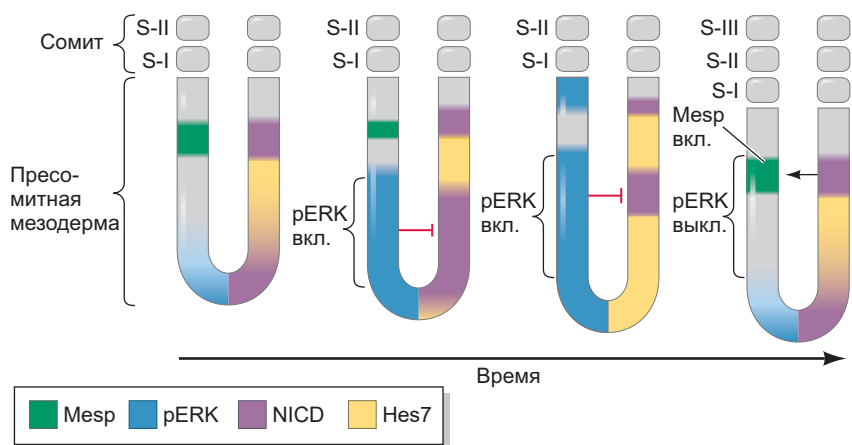
Связь часов и волнового фронта с Нох-опосредованной осевой идентичностью и завершением сомитогенеза

Сомитогенез не может продолжаться бесконечно; он должен завершиться и создать необходимую клеткам передне-заднюю идентичность. Как упоминалось ранее, Нох-гены с пространственной и временной колинеарностью экспрессии играют первостепенную роль в определении осевой идентичности от головы до хвоста. Как часовый механизм и фронт детерминации связаны с функционированием Нох-генов?

При экспериментальном изменении концентрации белка Fgf8, приводящем к формированию дополнительных (хотя и меньших по размеру) сомитов, соответствующая экспрессия Нох-генов будет активирована в сомите с соответствующим порядковым номером, даже если он находится в другом

¹ Эта ситуация во многом напоминает развитие почки конечности (Pourquié, 2011) (см. гл. 19). Там тоже пул вновь образованных клеток поддерживается за счет FGF в относительно недифференцированном и миграторном состоянии, а дифференцировка в периодические элементы (хрящи конечности) происходит при взаимодействии градиентов FGF и ретиноевой кислоты.

Рис. 17.17. Вероятная модель работы «часов и волнового фронта» при спецификации сомита. На каждом изображении слева показаны паттерны активности для регулятора транскрипции (pERK), индуцируемого FGF, и для транскрипционного фактора спецификации сомита (Mesp), а справа отражены паттерны производного от Notch фактора транскрипции (NICD) и индуцируемого им ингибиторного белка Hes7. (По данным: Y. Niwa et al., 2011. *Genes Dev* 25: 1115–1120.)



положении вдоль передне-задней оси. Это означает, что фронт детерминации (градиент активности FGF) в первую очередь влияет на размер сомита, а не на экспрессию Нох-генов. Однако мутации, которые затрагивают работу автономных часов сегментации, влияют на активацию соответствующих месту Нох-генов (Dubrulle et al., 2001; Zákány et al., 2001). Регуляция Нох-генов с помощью часов сегментации, по-видимому, позволяет координировать образование и спецификацию новых сегментов. Как именно механизмы сомитогенеза влияют на экспрессию Нох-генов, до конца не известно. Исследования на лягушке *Xenopus* показали, что осциллирующий ген и рецептор Notch *XDelta2* может активировать, по меньшей мере, три паралогические группы Нох и инициировать петлю положительной обратной

связи с Нох-белками (Peres et al., 2006). С учетом такой корреляции можно предположить, что часы сегментации могут напрямую запускать синхронизированную во времени активацию Нох-генов; однако неизвестно, происходит ли это колинеарным образом и задействует ли модификацию хроматина, как было описано выше для экспрессии Нох-генов.

Сразу после инициации экспрессии Нох-генов вдоль туловища она начинает влиять на фронт детерминации и завершать удлинение оси и сомитогенез. В частности, колинеарная активация экспрессии Нох-генов, расположенных ближе к 5'-концу кластеров, приводит к относительно большей репрессии Wnt-пути в хвостовой почке (рис. 17.18; Denans et al., 2015). Напомним, что Wnt3a секретируется из хвостовой почки и аналогично Fgf8 распростра-

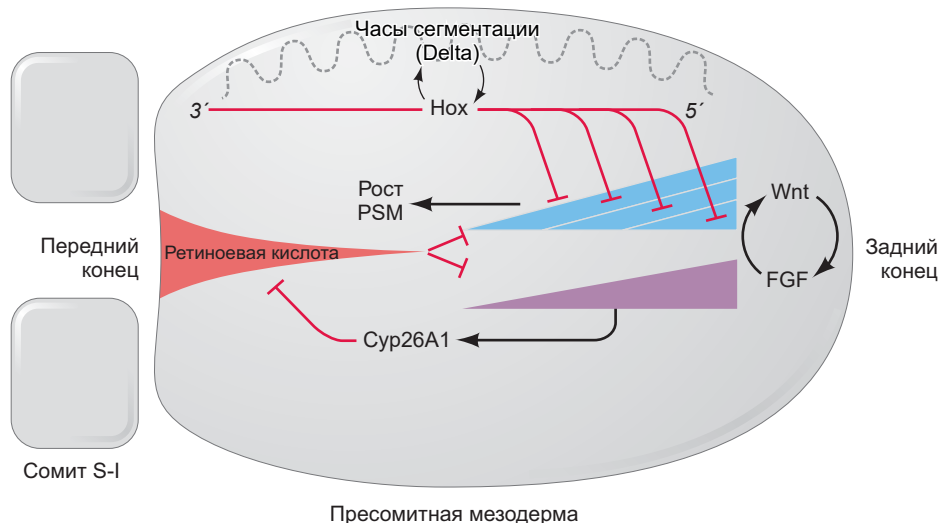


Рис. 17.18. Модель регуляторных механизмов сомитогенеза. Молекулярные часы сегментации через Notch-Delta определяют порядок экспрессии Нох-генов, которые частично блокируют Wnt-сигналинг и косвенно подавляют экспрессию Fgf8. Таким образом, на активность исходящих сзади сигналов Wnt/Fgf8, которые создают фронт детерминации, влияют как Нох-гены, так и развивающиеся передние структуры посредством ретиноевой кислоты. Ретиноевая кислота ингибирует Fgf8 и Wnt3a, тогда как Fgf8 способен репрессировать ретиноевую кислоту через Cyp26A1. Благодаря такому балансу сигнальных взаимодействий передние сомиты формируются раньше задних. (© Michael Barresi.)

няется вперед в виде градиента. Wnt3a стимулирует миграцию нейромезодермальных предшественников в PSM, обеспечивая таким образом рост PSM и удлинение оси (Dunty et al., 2008). По мере перемещения новых клеток в PSM, руководствуясь правилом временной координатности, они начинают экспрессировать все больше 5'-концевых Нох-генов, что ведет к постепенному уменьшению активности Wnt и замедлению роста хвостовой почки. У амниот часы сегментации существенно не изменяют свою скорость в течение этого времени; следовательно, скорость образования сомитов будет опережать рост хвостовой почки и истощать запасы клеток PSM, что приведет к окончанию сомитогенеза (Denans et al., 2015). Более того, опосредованное Нох-генами замедление роста хвостовой почки усиливается прямой репрессией FGF-сигналинга двумя способами. Во-первых, поступающая из сомитов ретиноевая кислота будет ингибировать экспрессию FGF с большей эффективностью; во-вторых, сигнальные пути Wnt и FGF будут функционировать в контуре обратной связи, поддерживая экспрессию друг друга в хвостовой почке (Aulehla et al., 2003; Young et al., 2009; Naiche et al., 2011). Из-за прогрессивной репрессии Wnt сигналинга с течением времени активность FGF также будет косвенно подавляться. В свою очередь, снизится уровень Cyp26A1, что обеспечит дополнительные условия для гиперактивации ретиноевой кислоты (Iulianella et al., 1999). Все данные в совокупности описывают модель, согласно которой временная координатная активация 5'-концевых Нох-генов замедляет удлинение оси посредством прямого ингибирования Wnt, что косвенно тормозит фронт детерминации и сокращает PSM (Denans et al., 2015).

Развитие склеротома

По мере созревания сомита он разделяется на два основных отдела — склеротом и дермомиотом. Эти области обнаружены у всех позвоночных, сходные структуры найдены даже у одного из наших ближайших беспозвоночных родственников — у головохордового *Amphioxus* (ланцетника), что указывает на их древнее происхождение (Devoto et al., 2006; Mansfield et al., 2015). Программы развития склеротома и дермомиотома различаются большой сложностью, включая эпителио-мезенхимные переходы (ЕМТ) и сигнальные каскады. Здесь мы приступаем к рассмотрению развития склеротома, а затем обсуждению формирования дермомиотома.

Вскоре после образования сомита как внешние эпителиальные клетки, так и внутренние мезенхимные клетки начинают проявлять признаки дифференцировки (рис. 17.19А, Д). Первые видимые изменения происходят в вентрально-медиальной части

сомита, где благодаря ЕМТ обособляется склеротом (рис. 17.19Б). ЕМТ обеспечивает появление мигрирующей популяции клеток, способных перемещаться вокруг медиальных осевых структур и формировать позвоночник. Непосредственно перед выселением из сомита клетки-предшественники склеротома экспрессируют транскрипционный фактор Pax1, который необходим для их перехода в мезенхиму и последующей дифференцировки в хрящ (Smith and Tuan 1996). Во время ЕМТ эпителиальные клетки теряют экспрессию N-кадгерина и становятся подвижной мезенхимой (рис. 17.19В, Г, Е; Sosis et al., 1997). Клетки склеротома экспрессируют также ингибиторы транскрипционных факторов мышечной дифференцировки — миогенные регуляторные факторы (MRF), к которым мы вернемся позже (Chen et al., 1996).

Как уже упоминалось, мезенхимные клетки склеротома можно подразделить на несколько областей (рис. 17.2Д). Хотя большинство склеротомных клеток становится предшественниками хряща позвонков и ребер, дорсальная часть склеротома (синдетом) образует сухожилия, а его медиальные клетки, расположенные ближе всего к нервной трубке, дают оболочки спинного мозга и кровеносные сосуды, которые будут снабжать спинной мозг питательными веществами и кислородом (Halata et al., 1990; Nimmagadda et al., 2007). Клетки из самого центра сомита (они остаются мезенхимными) также вносят вклад в склеротом, становясь суставами позвонков, хрящевыми дисками между позвонками (межпозвоночными дисками) и ближайшими к позвонкам участками ребер (Mittapalli et al., 2005; Christ et al., 2007; Scaal, 2015). Эта центральная область сомита была названа артротомом.

Так же как и у любого объекта недвижимости, развитие конкретного региона сомита зависит от трех факторов: местоположения, местоположения и еще раз местоположения. Местоположение областей сомита соседствует с различными сигнальными центрами, такими как хорда и дно нервной трубки (источники Sonic hedgehog и Noggin), нервная трубка (источник Wnt и BMP) и поверхностный эпителий (тоже источник Wnt и BMP) (рис. 17.20). Предшественники склеротома расположены в вентрально-медиальной части сомита и, следовательно, находятся в непосредственной близости от хорды. Эти клетки становятся склеротомом благодаря выделяемым хордой паракринным факторам, например Sonic hedgehog (Fan and Tessier-Lavigne, 1994; Johnson et al., 1994). Если части хорды куриного зародыша трансплантировать рядом с другими областями сомита, эти области тоже станут клетками склеротома. Хорда и сомиты секретируют также белки-антагонисты BMP — Noggin и Gremlin. Отсутствие BMP является критическим фактором, позволяющим Sonic hedgehog индуцировать дифференцировку хряща; при недостаточности одного из этих ингибиторов BMP

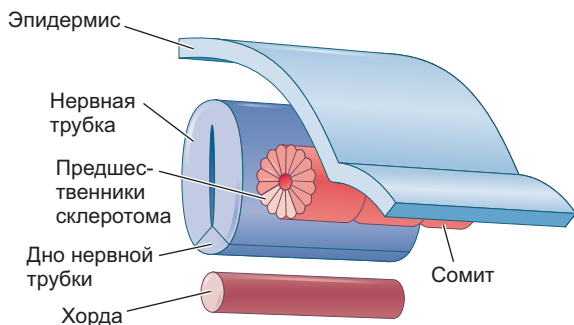
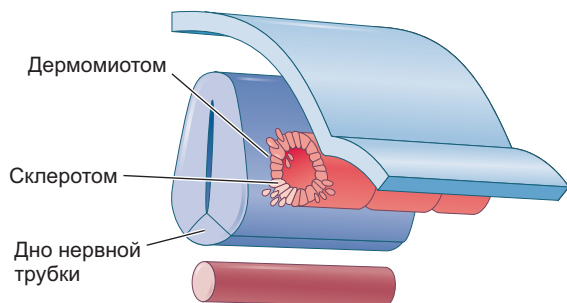
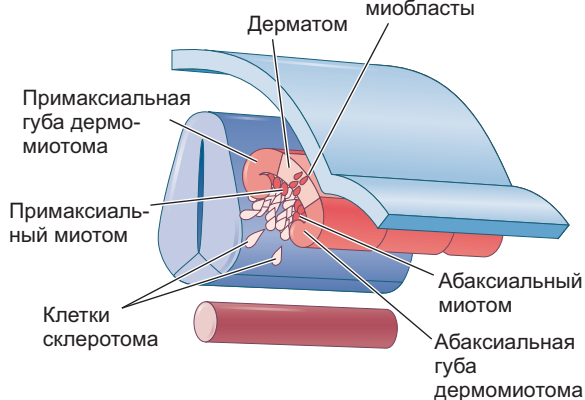
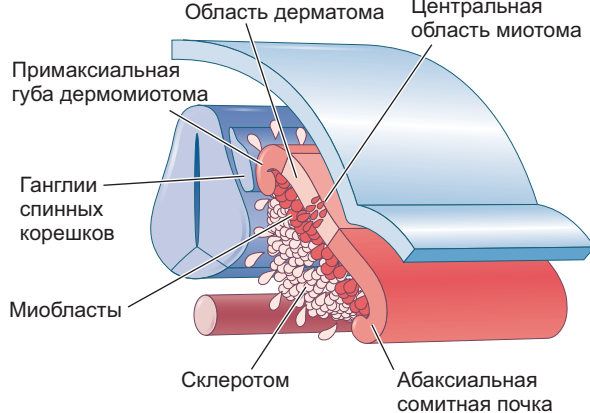
А Двухдневный зародыш**Б** Трехдневный зародыш**В** Четырехдневный зародыш**Г** Поздний четырехдневный зародыш**Д****Е**

Рис. Д и Е из: B. Christ et al., 2004. *Anat Embryol (Berl)* 208: 333–350, с разрешения: H. J. Jacob и B. Christ

Рис. 17.19. Поперечный разрез через туловище куриного зародыша в возрасте 2–4 суток развития. **А.** У двухдневного зародыша клетки склеротома уже можно отличить от остальной части сомита. **Б.** На третий день клетки склеротома теряют контакты друг с другом и мигрируют к нервной трубке. **В.** На четвертый день оставшиеся клетки сомита делятся. При этом медиальные клетки дают примаксиальный миотом, залегающий под дермомиотомом, а из клеток наиболее латеральной части сомита образуется абаксиальный миотом. **Г.** Сплошной слой мышечных предшественников (миотом) образуется под эпителиальным дермомиотомом. **Д, Е.** Сканирующие электронограммы соответствуют схемам (А) и (Г); 1 — нервная трубка; 2 — хорда; 3 — дорсальная аорта; 4 — поверхностная эктодерма; 5 — промежуточная мезодерма; 6 — дорсальная половина сомита; 7 — вентральная половина сомита; 8 — сомитоцель/артротом; 9 — центральный склеротом; 10 — вентральный склеротом; 11 — латеральный склеротом; 12 — дорсальный склеротом; 13 — дермомиотом. (Рис. А и Б по данным: J. Langman, 1981. *Medical Embryology*, 4th ed. Williams & Wilkins, Baltimore; Рис. В и Г по данным: C. P. Ordahl, 1993. In *Molecular Basis of Morphogenesis*, M. Bernfield [Ed.], pp. 165–170. Wiley-Liss, New York.)

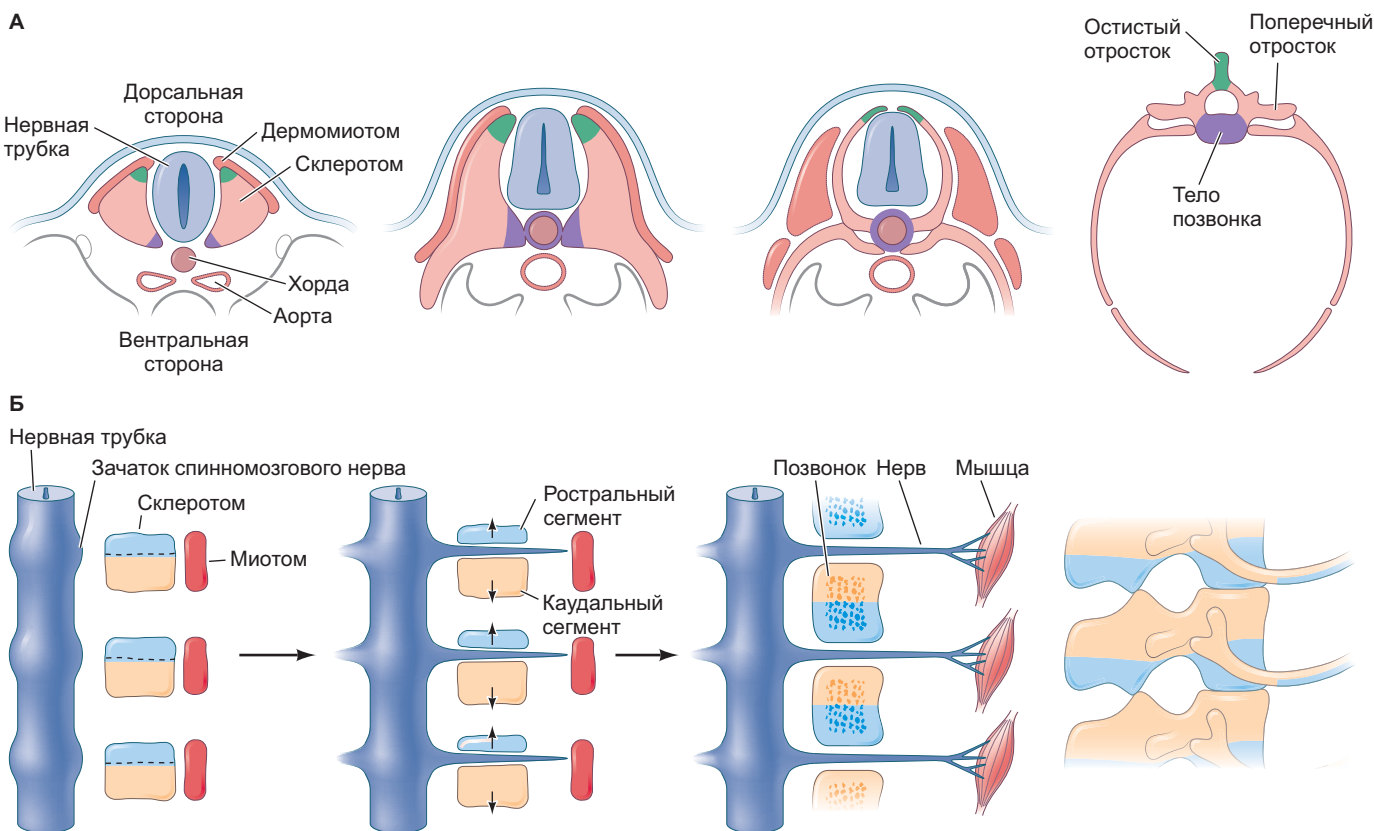


Рис. 17.21. Ресегментация склеротома при формировании позвонков. **А.** Последовательные стадии развития склеротома в позвонки. **Б.** Каждый склеротом разделяется на передний и задний участки. По мере того как спинномозговые нервы растут к периферии для иннервации мышц, сформированных миотомами, передний участок каждого склеротома объединяется с задним участком предшествующего склеротома, образуя зачаток позвонка. (Рис. А по данным: V. Christ et al., 2000. *Anat Embryol (Berl)* 202: 179–194; Рис. Б по данным: W. J. Larsen, 1998. *Essentials of Human Embryology*. Churchill Livingstone: New York; H. Aoyama and K. Asamoto, 2000. *Mech Dev* 99: 71–82.)

насекомые при построении сегментов из парасегментов (см. гл. 9). Движения изгибания и скручивания позвоночника обеспечивают межпозвоночные (синовиальные) суставы, образующиеся из артротомной области склеротома. Отделение клеток склеротома от артротома приводит к неспособности формировать синовиальные суставы и к слиянию соседних позвонков (Mittapalli et al., 2005).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ХОРДА ПОДДЕРЖИВАЕТ МОРФОГЕНЕЗ И СТАНОВИТСЯ ЧАСТЬЮ МЕЖПОЗВОНКОВОГО ДИСКА

Секретируя Sonic hedgehog, хорда приобретает первостепенное значение для развития склеротома. Как мы обсуждали ранее, хорда важна также для удлинения оси, что сказывается на морфогенезе позвоночника. У *Danio* нарушение вакуоляризации

клеток хорды приводит к деформации всего зачатка и последующему сращению позвонков и связанным с ним дефектам позвоночника (Ellis et al., 2013). Дополнительные доказательства того, что правильное формирование хорды необходимо для надлежащего развития позвоночника, получены в экспериментах по разрушению оболочки из внеклеточного матрикса, окружающего хорду. При нарушении синтеза одного из коллагенов в этой оболочке у *Danio* хорда изгибается, что приводит к нерегулярному остеогенезу, сращению позвоночника и его искривлению, подобно сколиозу у людей (рис. 17.22А, Б; Gray et al., 2014). Каково будущее хорды у взрослого организма? Распространено заблуждение, что хорда полностью деградирует после осуществления индукции и осевой поддержки. В этом сценарии есть доля правды, так как после образования позвонков некоторые клетки хорды, очевидно, погибают в результате апоптоза, вероятно, вызванного механическими

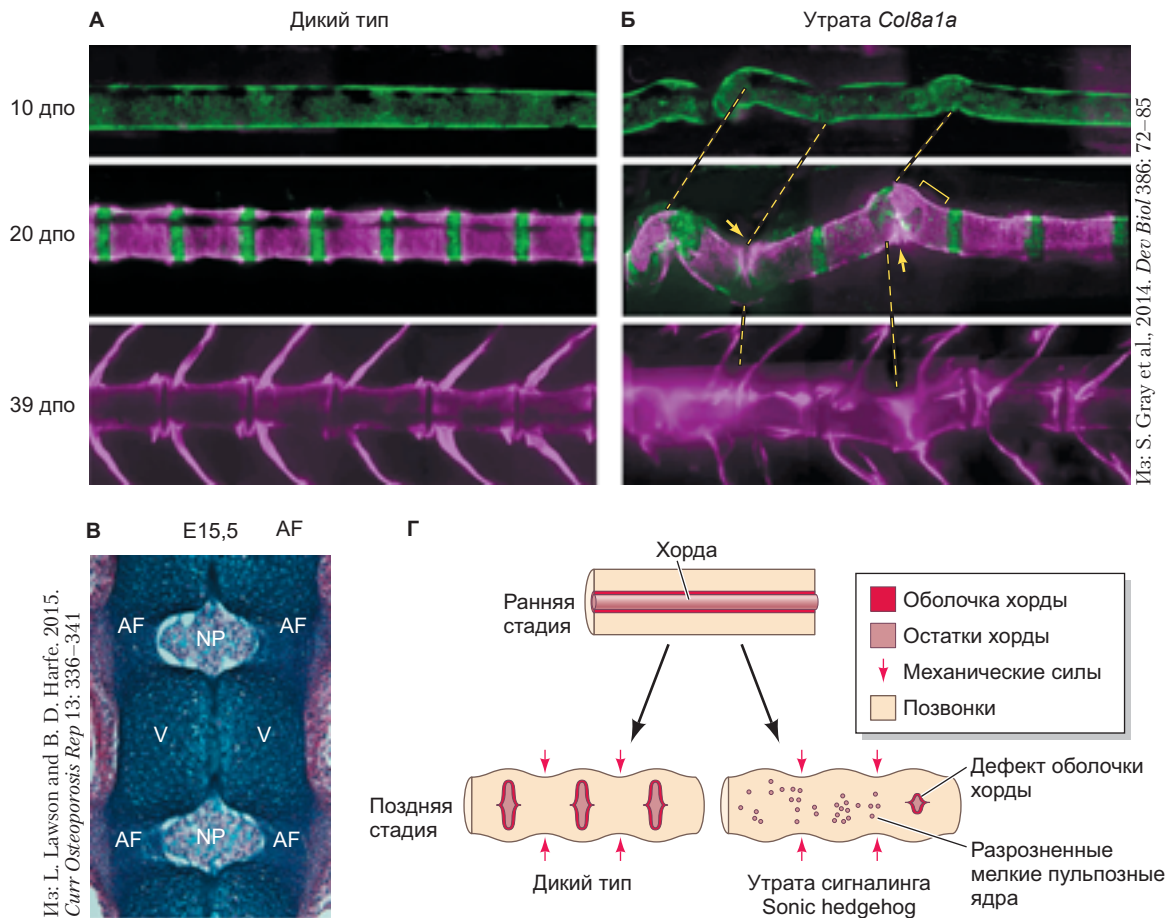


Рис. 17.22. Развитие позвоночника и межпозвоночных дисков. **А.** Коллаген 8a1a обычно экспрессируется вдоль всей хорды, подобно паттерну, который демонстрируют трансгенные *Danio* с репортером *Col2a1* (зеленый); дпо — дни после оплодотворения. **Б.** Утрата *Col8a1a* приводит к явной неспособности формировать прямой позвоночник и наличию слитых позвонков, выявленных ализариновым красным (окраска на костную ткань; пурпурный цвет). **В.** Позвонки с ассоциированным пульпозным ядром (NP, *nucleus pulposus*) межпозвоночного диска у мышиного зародыша на стадии E15.5. V — позвонок; AF — фиброзное кольцо (*annulus fibrosus*). **Г.** Модель, объясняющая функцию оболочки хорды в сохранении ее небольших фрагментов, которые развиваются в пульпозные ядра. Нарушение трансдукции сигнала *Sonic hedgehog* (у мутантов по *smoothened*) приводит к разной степени редукции хордовой оболочки и, как следствие, к неспособности формировать пульпозные ядра. (Рис. Г по данным: K. S. Choi and B. D. Harfe, 2011. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 9484–9489.)

силами. Интересно, что под влиянием тех же самых сил растяжения от разрастания позвонков хорда распадается на более мелкие фрагменты, которые развиваются в пульпозные ядра (*nucleus pulposus*) (рис. 17.2Е; Aszódi et al., 1998; Choi et al., 2008; Guehring et al., 2009; McCann et al., 2011; Risbud and Shapiro, 2011; Chan et al., 2014; Lawson and Harfe, 2015). Важно отметить, что происхождение пульпозных ядер было подтверждено в современных экспериментах по наблюдению за линиями развития клеток у мышей (Choi et al., 2008; McCann et al., 2011). Пульпозные ядра образуют гелеобразную массу в центре межпозвоночных дисков, которые

оказаны фиброзным кольцом из соединительной ткани склеротомного происхождения (рис. 17.22В). Это те самые межпозвоночные диски, которые «защемляются» при определенных травмах спины.

Мало что известно о механизмах образования межпозвоночных дисков, но, по всей видимости, оболочка хорды крайне важна для развития пульпозных ядер (Choi and Harfe, 2011; Choi et al., 2012). При экспериментальном ослаблении внеклеточной оболочки давление формирующихся тел позвонков приводит к рассеиванию клеток хорды, и поэтому пульпозные ядра не образуются (рис. 17.22Г; Choi and Harfe, 2011).

Загадки развития

У некоторых видов, например у курицы, пульпозные ядра не развиваются. Что же происходит с хордовыми клетками у этих животных? Они дегенерируют или вносят свой вклад в другие структуры позвоночника? Кроме того, возникает вопрос, какие молекулярные сигналы, помимо механических сил, контролируют развитие пульпозных ядер. Обратим внимание на набор индукторов, присутствующих в медиальных структурах (белки Eph-ephrin, netrin, slit); могут ли они направлять клетки хорды к объединению в периодически расположенные центры? Удивительно, но, несмотря на «центральную» роль хорды в эмбриогенезе, фундаментальные вопросы о линии развития ее собственных клеток остаются нерешенными.

Формирование сухожилий: синдетом

Дорсальная часть склеротома становится четвертым отделом сомита — синдетомом. Формирующие сухожилия клетки синдетома хорошо определяются по экспрессии гена *Scleraxis* (рис. 17.23; Schweitzer et al., 2001; Brent et al., 2003). Поскольку не существует явного морфологического различия между клетками склеротома и синдетома (все они мезенхимные), наши знания об этом компартменте сомита были ограничены до обнаружения молекулярных маркеров (*Pax1* для склеротома, *Scleraxis* для синдетома), позволяющих дифференциально исследовать пути развития этих клеток.

Сухожилия соединяют мышцы с костями, поэтому неудивительно, что синдетом (от греч. *syn* —

связанный) происходит от самой дорсальной части склеротома, которая примыкает к образующему мышцы миотому (рис. 17.24А). Синдетом формируется под действием секреции миотомом Fgf8 на непосредственно нижележащий ряд клеток склеротома (Brent et al., 2003; Brent and Tabin, 2004). Некоторые транскрипционные факторы ограничивают активность *Scleraxis*, так что формируется две полосы его экспрессии — в передней и задней частях синдетома (рис. 17.24Б). Между тем, под влиянием Sonic hedgehog из хорды и дна нервной трубки предшественники хряща синтезируют транскрипционные факторы Sox5 и Sox6, которые блокируют транскрипцию *Scleraxis* и в то же время активируют прохондрогенный фактор Sox9 (Yamashita et al., 2012). Так хрящ защищает себя, противодействуя сигналу Fgf8. Затем сухожилия срастаются с мышцами, расположенными непосредственно над ними, и со скелетными элементами (включая ребра), лежащими по обе стороны от них (рис. 17.24В; Brent et al., 2005).

Развитие дермомиотома

Дермомиотом занимает дорсально-латеральную половину сомита, и, в отличие от склеротома, который после ЕМТ превращается в мезенхиму, он по большей части сохраняет эпителиальную структуру. Различные исследования, включая картирование путей развития клеток химер перепела и курицы, выявили, что дермомиотом можно подразделить на три части: дерматом, миотом и мигрирующие миобласты (см. рис. 17.2; Ordahl and Le Douarin, 1992; Brand-Saberi

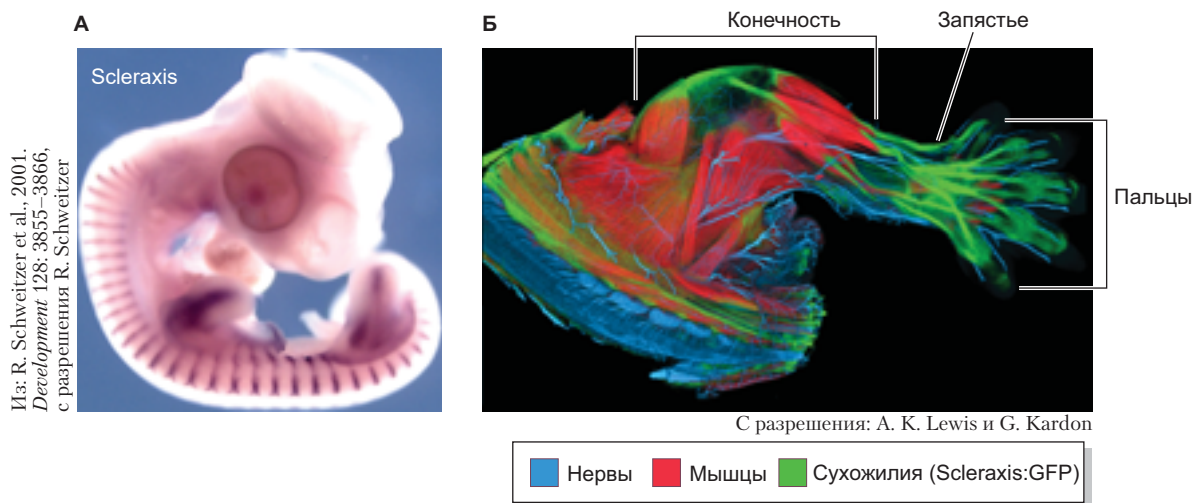


Рис. 17.23. *Scleraxis* экспрессируется в предшественниках сухожилий. **А.** Гибридизация *in situ* показывает характер экспрессии *Scleraxis* у куриного зародыша. **Б.** Конечность, запястье и пальцы новорожденной мыши. *Scleraxis* (репортерный трансген) выявлен в сухожилиях (зеленый цвет), соединяющих мышцы (окрашены антителами к миозину; красный цвет). Нейроны показаны синим цветом; окраска антителами к белкам нейрофиламентов

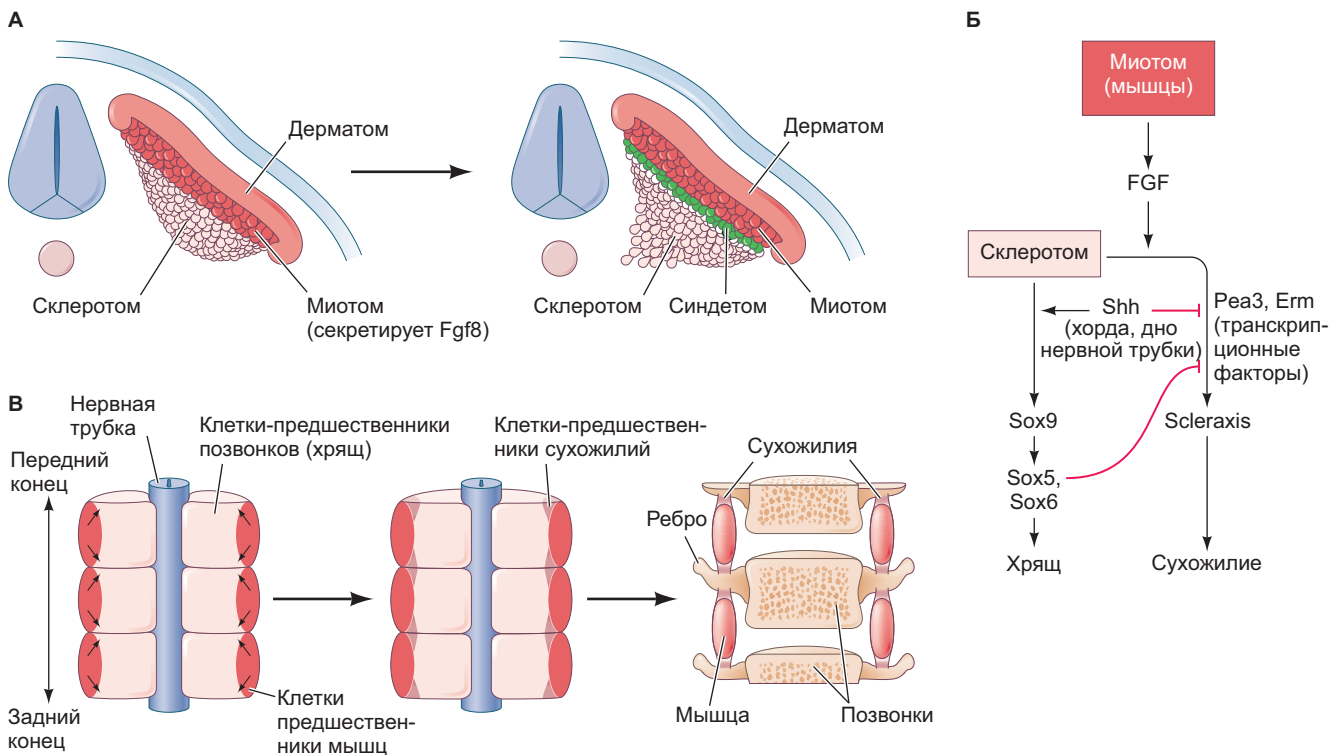


Рис. 17.24. Индукция Scleraxis в склеротоме у курицы под влиянием Fgf8 из миотома. **А.** До спецификации предшественников сухожилий происходит сегрегация дерматома, миотома и склеротома. Определение статуса будущих сухожилий (синдетома) происходит в самом дорсальном ярусе клеток склеротома с помощью Fgf8, полученного из миотома. **Б.** Путь, по которому сигналы Fgf8 из клеток-предшественников мышц заставляют нижележащие клетки склеротома развиваться в сухожилия. **В.** Клетки синдетома мигрируют (маленькие стрелки) вдоль развивающихся позвонков. Они дифференцируются в сухожилия, соединяющие ребра с межреберными мышцами, которые так нравятся любителям свиных ребрышек на гриле. (Рис. А, В по данным: A. E. Brent et al., 2003. *Cell* 113: 235–248.)

et al., 1996; Kato and Aoyama, 1998). Клетки в двух боковых областях эпителия дермомиотома называют дорсально-медиальной и вентрально-латеральной губами (они находятся либо ближе всего, либо дальше всего от нервной трубки). Вместе эти участки функционируют как зоны предшественников миотома, дающего клетки скелетных мышц тела и конечностей. Клетки-предшественники мышц **миобласты** выселяются из дорсально-медиальной и вентрально-латеральной губ и мигрируют под эпителием дермомиотома, образуя собственно миотом (рис. 17.24А). Ближайший к нервной трубке участок миотома дает начало центрально расположенным **примаксиальным мышцам**, которые включают межреберную мускулатуру и глубокие мышцы спины. Наиболее удаленные от нервной трубки миобласты формируют **абаксиальные мышцы** стенки тела, конечностей и языка¹. Дерматом расположен в центральной части дермомиотома и образует дерму спины и некоторые другие производные. Границу между примаксиальными и абаксиальными мышцами, а также между участками дермы, происходящими из сомита и из латеральной пластинки, называют **латеральной сомитной**

границей (рис. 17.25; Christ and Ordahl, 1995; Burke and Nowicki, 2003; Nowicki et al., 2003). Примаксиальные и абаксиальные мышцы различаются не только происхождением, но и наборами транскрипционных факторов.

Дерма вентральной части тела образована мезодермой боковой пластинки, а дерма головы и шеи, по крайней мере частично, поступает из черепного нервного гребня. Однако в туловище предшественники дермы спины являются основным продуктом дерматома. Кроме того, недавно проведенные исследования показали, что центральный участок дермомиотома производит также популяцию мышечных клеток (Gros et al., 2005; Relaix et al., 2005). По-

¹ Используемые здесь термины *примаксиальный* и *абаксиальный* обозначают мышцы, происходящие из медиальной и латеральной частей сомита соответственно. Широко применяемое деление на *эпаксиальные* и *гипаксиальные* мышцы имеет в своей основе не источник происхождения, а вторичные модификации анатомии, представленные во взрослом состоянии (гипаксиальные мышцы иннервируются вентральными областями спинного мозга) (Nowicki et al., 2003).

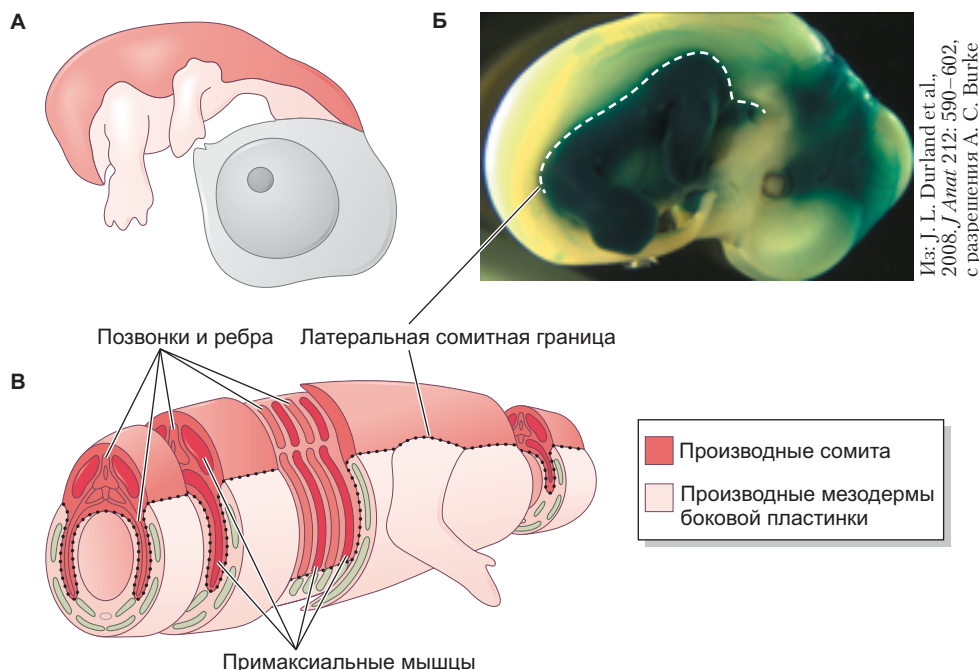


Рис. 17.25. Примаксиальный и абаксиальный домены мезодермы у позвоночных. **А.** Картирование мезодермы различного происхождения (оттенки красного) на ранней стадии развития куриного зародыша. **Б.** Экспрессия гена *Prx1* (темное окрашивание) в абаксиальной области туловища на стадии развития мышцы E12,5. Граница между окрашенными и неокрашенными участками является латеральной сомитной границей (пунктирная линия). **В.** Регионализация мезодермы, наблюдаемая у 13-дневного куриного зародыша. (Рис. А, В по данным: В. В. Winslow et al., 2007. *Dev Dyn* 236: 2371–2381.)

этому некоторые исследователи (Christ и Ordahl, 1995; Christ et al., 2007) предпочитают использовать только термин *дермомиотом* (или *центральный дермомиотом*) для этого эпителиального зачатка. Вскоре эта часть сомита тоже подвергается ЕМТ. Сигналы FGF от миотома активируют в клетках центрального дермомиотома транскрипцию гена *Snail2*, белковый продукт которого служит хорошо известным регулятором ЕМТ (см. рис. 15.9; Delfini et al., 2009). В ходе ЕМТ митотические веретена эпителиальных клеток ориентируются вдоль дорсально-вентральной оси, что ведет к тангентальным (периклиным) делениям. Вентральная дочерняя клетка присоединяется к миообластам миотома, а дорсальная становится предшественником дермы. Как и в случае с клетками склеротома, в процессе ЕМТ происходит подавление N-кадгерина, удерживающего клетки вместе, поэтому продукты деления расходятся в различных направлениях, а оставшийся N-кадгерин может быть обнаружен только в клетках, пополняющих миотом (Ben-Yair and Kalcheim, 2005).

Клетки-предшественники мышц, которые делают миотом от эпителиальной пластинки для присоединения к первичным клеткам миотома, остаются недифференцированными и быстро пролиферируют, в итоге давая большую часть миообластов. В то время как большинство миогенных клеток-предшественников превращаются в мышцы, некоторые остаются недифференцированными и окружают зрелые мы-

шечные волокна. Недифференцированные клетки становятся стволовыми клетками скелетных мышц, называемыми **клетками-сателлитами**. Именно эта популяция обеспечивает постнатальный рост мышц и их восстановление.

Детерминация центрального дермомиотома

Центральный дермомиотом образует как мышечные предшественники, так и клетки соединительной ткани слоев кожи спины. Дерма вентральной и боковых сторон тела происходит от мезодермы боковой пластинки. Поддержание центрального дермомиотома зависит от Wnt6 из эпидермиса (Christ et al., 2007), а его ЕМТ, по-видимому, регулируют секретируемые факторы нервной трубки neurotrophin 3 (NT3) и Wnt1 (см. рис. 17.20). Прижизненное применение антител против NT3 предотвращает трансформацию эпителиального дерматома в рыхлую дермальную мезенхиму, которая должна мигрировать под эпидермис (Brill et al., 1995). Удаление или переворот нервной трубки вокруг собственной оси тоже подавляет образование этой дермы (Takahashi et al., 1992; Olivera-Martinez et al., 2002). Сигналы Wnt от эпидермиса способствуют дифференцировке дорсально мигрирующих клеток центрального дермомиотома в дерму (Atit et al., 2006).

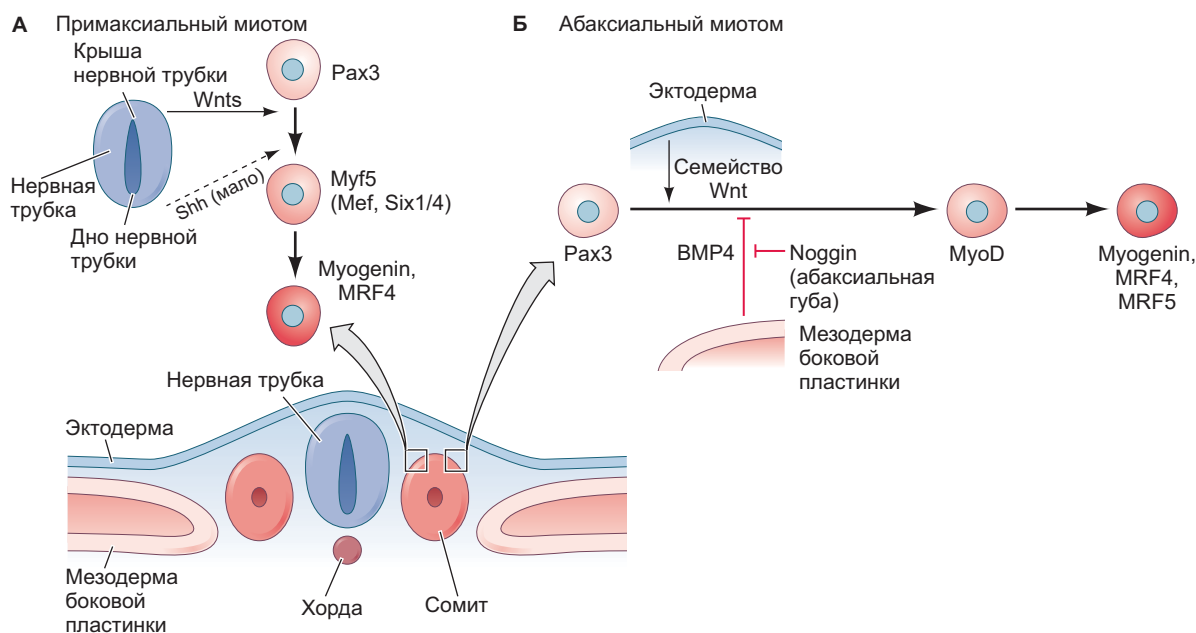


Рис. 17.26. Дифференциальная экспрессия генов в миотоме. **А.** Предполагается, что индукция примаксиального миотома происходит под влиянием комбинации Wnt (вероятно, Wnt1 и Wnt3a) из крыши нервной трубки в сочетании с низкими концентрациями Sonic hedgehog из дна нервной трубки. Pax3 в сомитных клетках обеспечивает экспрессию миогенного фактора транскрипции Myf5 в ответ на паракринные сигналы. Myf5 в сочетании с белками Six и Mef2 обеспечивает активацию миогенина и MRF4. **Б.** Сигнал BMP4 ингибирует секретирующие Noggin клетки, которые специфически мигрируют к губам сомита. Считается, что в отсутствие BMP4 белки Wnt из эпидермиса индуцируют абаксиальный миотом. (По данным: V. G. Punch et al., 2009. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1: 128–140.)

Мышцы и дерма, однако, не единственные производные центрального дермомиотома. Было показано, что **клетки бурого жира** (адипоциты) тоже происходят из сомитов, причем с наибольшей вероятностью именно из центрального дермомиотома (Atit et al., 2006). Бурый жир играет активную роль в энергетическом обмене, важен для производства тепла (в отличие от более известной белой жировой ткани, которая лишь накапливает жир). Обнаружено, что скелетные мышцы и бурые жировые клетки происходят от одного и того же сомитного предшественника, который первоначально экспрессирует миогенные регуляторные факторы (Tseng et al., 2008). В будущих клетках бурого жира (вероятно, под влиянием BMP7) происходит индукция фактора транскрипции PRDM16. Данный белок, по-видимому, является критическим для превращения миобластов в клетки бурого жира, поскольку активирует набор генов, специфичных для сжигания жира в бурых адипоцитах (Kajimura et al., 2009).

Детерминация миотома

Вся скелетная мускулатура в теле позвоночных, за исключением мышц головы, происходит из дермомиотома сомитов. Миотом происходит из боковых

краев или «губ» дермомиотома, которые образуют складки, объединяющиеся в сплошной слой между более периферическим дермомиотомом и более медиальным склеротомом. Основными факторами транскрипции, сопровождающими (и вызывающими) развитие мышц, являются **миогенные регуляторные факторы** (MRF, иногда их называют миогенными bHLH-белками). Это семейство транскрипционных факторов включает MyoD, Myf5, myogenin и MRF4 (рис. 17.26). Каждый член семейства может активировать другие гены семейства, обеспечивая положительную обратную связь столь мощную, что активация MRF практически в любой клетке организма превращает эту клетку в мышечную¹.

Факторы MRF связываются с регуляторными областями и активируют гены, незаменимые для функционирования мышц. Например, белок MyoD, по-видимому, непосредственно активирует специ-

¹ Общее правило развития гласит, что над влиятельными игроками должен осуществляться строгий контроль. В связи со способностью превращать любую клетку в мышцу, факторы MRF являются одними из наиболее сильно контролируемых объектов генома. Их регуляция осуществляется на нескольких этапах транскрипции, равно как и в ходе процессирования, трансляции и посттрансляционных модификаций (Sartorelli and Juan, 2011; Ling et al., 2012).

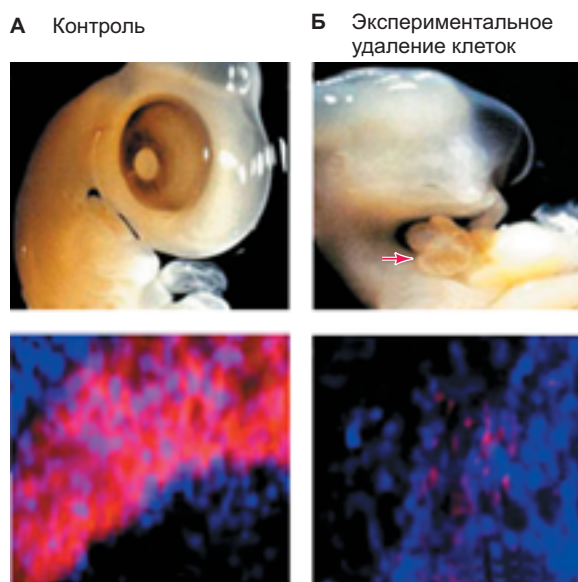
фичный мышечный ген креатинфосфокиназы, связываясь с ДНК перед ее кодирующей последовательностью (Lassar et al., 1989). У курицы вблизи генов, кодирующих субъединицы мышечного рецептора ацетилхолина, тоже есть два сайта ДНК для связывания MyoD (Piette et al., 1990). Кроме того, MyoD способен напрямую активировать собственный ген. Следовательно, сразу после активации гена *MyoD* его белковый продукт связывается на ДНК непосредственно с *MyoD* и сохраняет свой ген в активном состоянии. Многие из MRF функционируют, только если ассоциированы со специфическим мышечным кофактором из семейства белков Mef2 (myocyte enhancer factor-2). MyoD может активировать ген *Mef2* и тем самым дифференциально регулировать временную экспрессию мышечных генов.

Как обсуждалось ранее, индукция миотома происходит в двух разных областях сомита, по меньшей мере, после двух различных сигналов (Punch et al., 2009). Исследования с использованием трансплан-

тации и нокаутных мышей показали, что *примаксиальные* миобласты из медиальной части сомита индуцируются факторами из нервной трубки (вероятно, это Wnt1 и Wnt3a из ее дорсальной области), а также низкими концентрациями Sonic hedgehog из дна нервной трубки (см. рис. 17.20; Münsterberg et al., 1995; Stern et al., 1995; Borycki et al., 2000). Эти лиганды побуждают Pax3-положительные клетки сомита активировать ген *Myf5* в примаксиальном миотоме. Myf5 (совместно с Mef2 и Six1 или Six4) активирует гены *Myogenin* и *MRF4*, белковые продукты которых запускают регуляторную сеть специфичных мышечных генов (рис. 17.26А; Buckingham et al., 2006). По всей видимости, клетки примаксиального миотома изначально заключены во внеклеточный матрикс из ламинина, который окаймляет дермомиотом и миотом. Однако по мере созревания мышечных предшественников этот матрикс растворяется и примаксиальные миобласты мигрируют вдоль тяжелой фибронектина. По достижении своего окончательного местоположения миобласты выстраиваются в один ряд, сливаются и разрастаются в длину, превращаясь в глубокие мышцы спины и соединяясь с развивающимися позвонками и ребрами (Deres et al., 2010, 2012).

Абаксиальные миобласты, формирующие мускулатуру конечностей и вентральной стенки тела, возникают из латеральной части сомита. Необходимыми для формирования этих мышечных предшественников считают два условия: 1) наличие сигналов Wnt; 2) отсутствие BMP (рис. 17.26Б; Marcelle et al., 1997; Reshef et al., 1998). Белки Wnt (особенно Wnt7a) вырабатываются в эпидермисе (см. рис. 17.22; Cossu et al., 1996a; Pourquie et al., 1996; Dietrich et al., 1998), но BMP4, выделяемый соседствующей мезодермой боковой пластинки, оказывается препятствием для мышечной спецификации.

Что же тогда блокирует активность BMP? Несколько исследований на куриных зародышах показали, что на вершине дорсально-медиальной и вентрально-латеральной губ дермомиотома закорены группы клеток, которые секретируют ингибитор BMP Noggin (Gerhart et al., 2006, 2011). Секретирующие Noggin клетки возникают очень рано, становятся частью эпибласта и отличаются тем, что синтезируют мРНК для MyoD, но не транслируют эту мРНК в белок. Далее эти клетки мигрируют, чтобы достичь параксиальной мезодермы и специфически распределиться по дорсально-медиальной и вентрально-латеральной губам дермомиотома. Там они синтезируют и секретируют Noggin, способствуя тем самым дифференцировке миобластов. Если секретирующие Noggin клетки удалить из эпибласта, по всему телу можно наблюдать недостаток скелетной мускулатуры, а вентральная стенка тела настолько слаба, что сердце и брюшные органы часто выпадают через нее, образуя грыжи (рис. 17.27). Этот дефект можно предотвратить путем имплантации

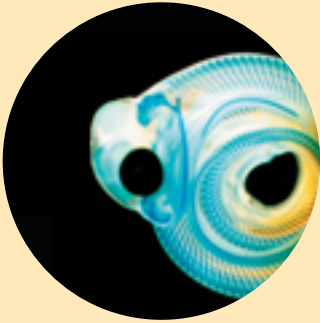


Из: J. Gerhart et al., 2006.
J Cell Biol 175: 283–292, с разрешения
J. Gerhart и M. George-Weinstein

Рис. 17.27. Удаление клеток, продуцирующих Noggin в губах дермомиотома, приводит к тяжелым дефектам мускулатуры. Клетки эпибласта, секретирующие Noggin, были удалены у куриного зародыша на стадии 2 с помощью антител против G8. **А.** Контрольный зародыш имеет нормальную морфологию (верхняя фотография) и обильное окрашивание на миозин в мышцах (нижняя фотография; *красный*). **Б.** В эксперименте обнаружены серьезные дефекты развития глаз, существенная редукция соматической мускулатуры и грыжа брюшных органов, выпирающих через тонкую брюшную стенку (верхняя фотография; *стрелка*). Сильное сокращение объема мускулатуры сопровождается уменьшением уровня экспрессии миозина (нижняя фотография)

бусин с *Noggin* в сомиты, лишенные соответствующей клеточной популяции. Сразу после блокировки BMP *Wnt7* приобретает способность индуцировать

в компетентных клетках дермомиотома синтез *MyoD*, который активирует батарею белков MRF, приводя к детерминации миогенных клеток.



С разрешения: Anne C. Burke

О фотографии в начале главы

Формирование сегментов, или сомитов — строго регулируемый процесс, который определяет, «какие, когда, где и сколько» сомитов развивается у организма. Фотография эмбриона змеи (садового ужа), окрашенного альциановым синим, прекрасно иллюстрирует грандиозный размах сомитогенеза. Сегменты параксиальной мезодермы делятся на последовательные блоки за счет координации *Fgf8*-опосредованного фронта детерминации, молекулярных часов *Notch-Delta* и формирования границы, основанной на *Eph-ephrin*.

17

Коротко Параксиальная мезодерма

1. Параксиальная мезодерма образует блоки ткани, называемые сомитами. Сомиты дают начало трем основным зонам: склеротому, миотому и центральному дермомиотому.
2. Пространственно-временная экспрессия *Нох*-генов в последовательности от 3'- к 5'-концу кластера вдоль параксиальной мезодермы коррелирует: 1) с постепенным разрыхлением структуры хроматина посредством эпигенетической регуляции; 2) с порядком поступления клеток в состав параксиальной мезодермы вдоль передне-задней оси. Задние градиентные сигналы *FGF* и *Wnt* поддерживают нейромезодермальные клетки-предшественники (NMP) в незрелом состоянии, тогда как противоположно направленный градиент ретиноевой кислоты способствуют дифференцировке данных клеток. Эти антагонистические сигналы определяют, где в пресомитной мезодерме будет образована граница нового сомита.
3. Циклическая активация сигнального пути *Notch-Delta* во всей пресомитной мезодерме определяет время формирования сегмента, а рецепторные системы *Eph* участвуют в физическом формировании границ. Более того, ГТФаза *Rho* и интегрин-фибронектиновые взаимодействия также, по-видимому, играют важную роль в превращении пресомитных мезодермальных клеток в эпителиальные.
4. Склеротом дает хрящевые закладки позвонков. Вблизи грудных позвонков склеротомные клетки образуют и ребра. Межпозвоночные суставы, мозговые оболочки и клетки дорсальной аорты тоже происходят из склеротома.
5. Примаксиальный миотом образует мускулатуру спины. Абаксиальный миотом дает мышцы стенки тела, конечностей и языка.
6. Центральный дермомиотом формирует дерму спины, а также предшественников для мышечных и бурых жировых клеток.
7. Области сомита определяют свое развитие под влиянием паракринных факторов, выделяемых соседними тканями. Спецификация склеротома в значительной степени находится под контролем *Sonic hedgehog*, который секретируют клетки хорды и дна нервной трубки. Две области миотома обеспечивают начало своей спецификации различными факторами, но в обоих случаях в клетках будущих мышц происходит индукция миогенных регуляторных факторов (MRF).
8. Основными источниками скелета служат сомиты (для осевого скелета), мезодерма боковой пластинки (для придатков), нервный гребень и мезодерма головы (для черепа и лица).
9. Сухожилия образуются в результате превращения дорсального слоя клеток склеротома в клетки синдетома, что контролируют лиганды *FGF*, секретируемые миотомом.

Промежуточная мезодерма и мезодерма боковой пластинки:

сердце, кровь и почки

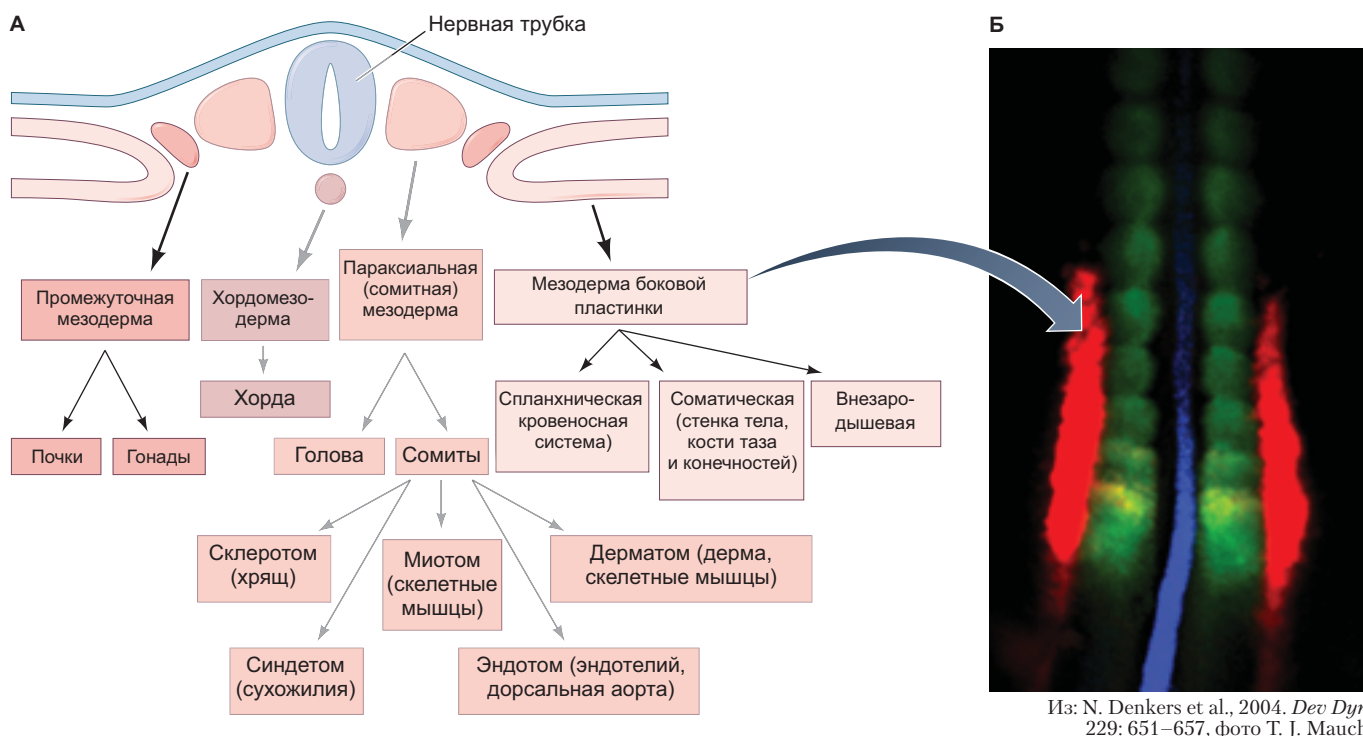
Как формируется сердце и связывается с артериями и венами?



© Vincent Pasque

В то время как аксиальная и параксиальная мезодермы образуют хорду и сомиты в спине, промежуточная мезодерма и мезодерма боковой пластинки распространяются по бокам и вентральной части тела. Промежуточная мезодерма образует мочеполовую систему, состоящую из почек, половых желез и связанных с ними протоков. Внешняя (кортикальная) часть надпочечников тоже происходит из этой области. В наибольшем удалении от хорды **мезодерма боковой пластинки** дает начало сердцу, кровеносным сосудам и клеткам крови, а также выстилке полостей тела. Она образует скелет конечностей и их поясов (но не мышц конечностей, которые имеют сомитное происхождение). Кроме того, мезодерма боковой пластинки участвует в формировании внезародышевых оболочек, которые важны для транспортировки питательных веществ к эмбриону (**рис. 18.1**).

Считается, что деление мезодермы на сегменты (на осевую, параксиальную, промежуточную и боковую пластинки) происходит вдоль медиолатеральной оси (от центра в боковые стороны) под влиянием увеличения количества BMP (Pourquié et al., 1996; TONEGAWA et al., 1997). В латеральной мезодерме куриного зародыша BMP4 экспрессируется на более высоком уровне, чем в срединных областях, так что в эксперименте можно изменить идентичность мезодермальной ткани, меняя экспрессию BMP. Хотя мы пока не вполне знаем, как происходит реализация этой молекулярной разметки, считается, что различные концентрации BMP могут вызывать дифференциальную экспрессию транскрипционных факторов семейства Forkhead (Fox). Ген *Foxf1* транскрибируется в тех регионах, которые станут боковой пластинкой и внезародышевой мезодермой, тогда как *Foxc1* и *Foxc2* экспрессируются в параксиальной мезодерме, которая будет формировать сомиты (Wilm et al., 2004). Если *Foxc1* и *Foxc2* совместно



Из: N. Denkers et al., 2004, *Dev Dyn* 229: 651–657, фото Т. J. Mauch

Рис. 18.1. Основные типы мезодермы у амниот. **А.** Схема расположения основных мезодермальных компартментов в зародыше амниот. **Б.** Выявление медиальных мезодермальных зачатков в туловище куриного зародыша, стадия 12 пар сомитов (около 33 ч). Гибридизацию *in situ* проводили с помощью зондов, распознающих мРНК *Chordin* (синий) в хорде, мРНК *Paraxis* (зеленый) в сомитах и мРНК *Pax2* (красный) в промежуточной мезодерме

удалены из генома мыши, параксиальная мезодерма переопределяет свое развитие как промежуточная мезодерма и инициирует экспрессию ее основного транскрипционного фактора *Pax2* (рис. 18.1Б).

В этой главе мы сосредоточимся на органах, которые связаны с производством и циркуляцией крови. Клетки крови происходят из мезодермы боковой пластинки, равно как сердце и большинство кровеносных сосудов, служащих для кровообращения. Почки образуются из промежуточной мезодермы. Эти органы отфильтровывают отходы из крови, а также значительно влияют на давление, состав и объем крови.

Промежуточная мезодерма: почка

Как заметил физиолог и философ Гомер Смит (Homer Smith, 1953), «...наши почки служат основным фундаментом нашей философской свободы. Только благодаря тому, что они работают в свойственной им манере, мы получили возможность иметь кости, мышцы, железы и мозг». Хотя это утверждение может показаться преувеличенным, человеческая почка представляет собой удивительно сложный орган, значение которого невозможно переоценить. Функ-

циональная единица почки — **нефрон** — содержит более 10 000 клеток, относимых, по меньшей мере, к 12 различным клеточным типам, каждый из которых выполняет определенную функцию и расположен в определенном месте по отношению к другим вдоль всей оси нефрона.

В развитии почки млекопитающих можно выделить три сменяющих друг друга стадии. Первые две стадии имеют транзитный характер, и только третья (последняя из них) даст функциональную почку. На ранних этапах развития (22-е сутки у человека, 8-е сутки у мыши) в промежуточной мезодерме вентрально-латеральное передних сомитов возникает **пронефрический проток**. Его клетки мигрируют в каудальном направлении, а передняя область протока индуцирует соседнюю мезенхиму к формированию **пронефроса**, представленного канальцами предпочки (которую еще называют головной почкой) (рис. 18.2А). У рыб и личинок амфибий канальцы пронефроса формируют функционирующие почки, но у амниот они, по-видимому, так и не достигают состояния активности. У млекопитающих канальцы и передняя часть протока пронефроса дегенерируют, но каудальные части протока и его производные сохраняются и служат центральным компонентом выделительной системы в ходе всего дальнейшего развития (Toivonen, 1945; Saxén, 1987). Этот сохра-

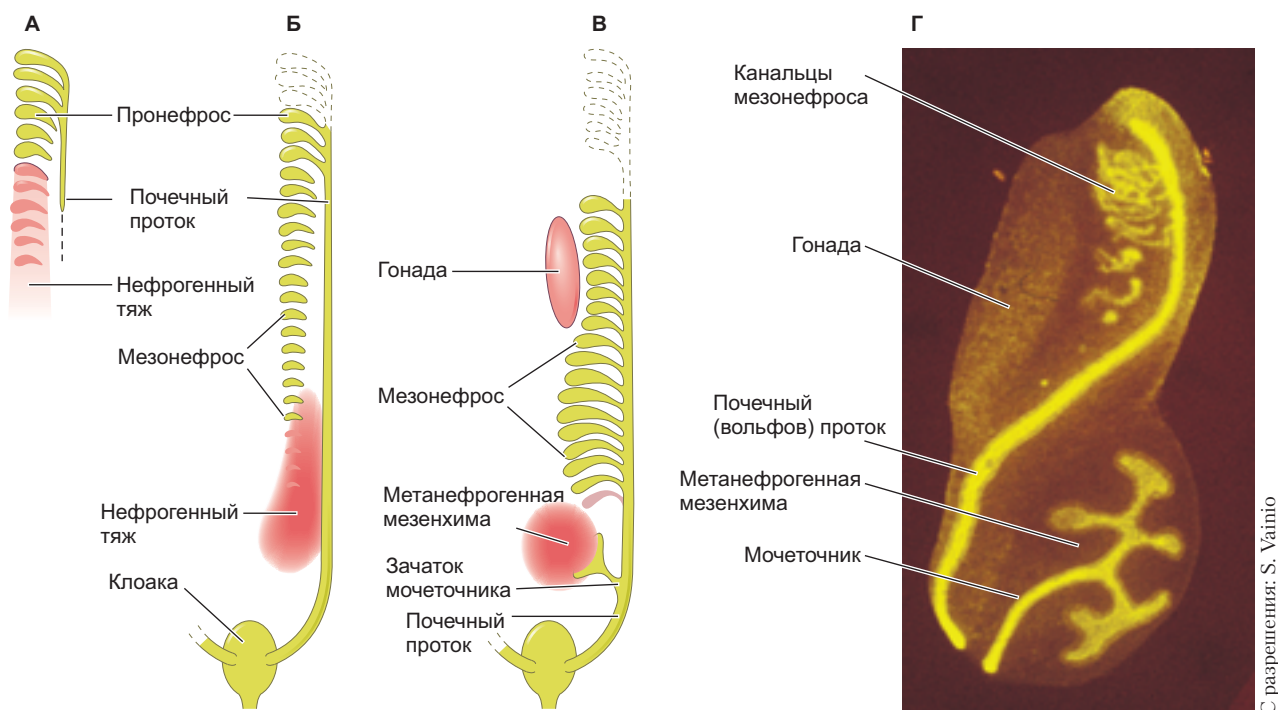


Рис. 18.2. Общая схема развития почки позвоночных. **А.** Первичные канальцы, составляющие пронефрос, индуцируют в нефрогенной мезенхиме пронефрический проток по мере его продвижения в каудальном направлении. **Б.** По мере дегенерации пронефроса происходит формирование канальцев мезонефроса. **В.** Конечную почку млекопитающих (метанефрос) индуцирует зачаток мочеточника, ответвляющийся от почечного протока. **Г.** Промежуточная мезодерма 13-суточного мышинного зародыша демонстрирует закладку метанефрической почки (внизу), в то время как еще хорошо различим мезонефрос. Ткань протока окрашена флуоресцентными антителами к цитокератину, обнаруженному в протоке пронефроса и его производных. (Рис. А–В по данным L. Saxén, 1987. *Organogenesis of the Kidney*. Cambridge University Press: Cambridge, UK.)

нившийся проток часто называют **почечным** или **вольфовым протоком**.

По мере того как канальцы пронефроса дегенерируют, средняя часть почечного протока индуцирует в прилегающей мезенхиме новую генерацию почечных канальцев. Эта совокупность канальцев представляет собой мезонефрос, или первичную почку (рис. 18.2Б; Sainio and Raatikainen-Ahokas, 1999). У некоторых видов млекопитающих мезонефрос кратковременно участвует в процессе фильтрации мочи, но у мышей и крыс в роли функциональной почки он не работает. У человека с 25-х суток формируется около 30 канальцев мезонефроса. По мере того как в каудальном направлении индуцируется все больше новых канальцев, начинается регрессия передних канальцев мезонефроса посредством апоптоза (интересно, что у мышей, наоборот, передние канальцы сохраняются, а задние исчезают; рис. 18.2В, Г).

Хотя все еще не известно, выполняет ли мезонефрос функцию фильтрации крови и образования мочи у человека, нет сомнения в том, что во время своего краткого существования он играет важную регуляторную роль в развитии. Во-первых, мезонефрос служит одним из главных источников гемопоэтических

стволовых клеток, необходимых для развития клеток крови (Medvinsky and Dzierzak, 1996; Wintour et al., 1996). Во-вторых, у самцов млекопитающих часть канальцев мезонефроса сохраняется и становится каналами, по которым сперма поступает из семенника в мочеиспускательный канал (придаток семенника (*epididymis*) и семявыносящий проток (*vas deferens*); см. гл. 6).

Постоянная почка амниот **метанефрос** развивается в результате сложного набора взаимодействий эпителиального и мезенхимного составляющих промежуточной мезодермы (Costantini and Koran, 2010; McMahon, 2016). На первых этапах коммитирование **метанефрической мезенхимы** (называемой еще метанефрогенной мезенхимой) происходит в задних отделах промежуточной мезодермы, где она индуцирует формирование ответвления от каждого из парных почечных протоков. Эпителиальные выросты называют **зачатками мочеточника**. В конечном счете они отделяются от почечного протока и становятся мочеточниками, по которым моча поступает в мочевой пузырь. Отделившись от почечного протока, зачатки мочеточника врастают в метанефрогенную мезенхиму.

Под влиянием зачатков мочеточника мезенхимная ткань конденсируется вокруг них и дифференцируется в нефроны почки млекопитающих. По мере своей дифференцировки мезенхима вызывает ветвление и рост зачатка мочеточника. Такие взаимные индуктивные процессы и обеспечивают формирование почки.

Спецификация промежуточной мезодермы: *Pax2*, *Pax8* и *Lim1*

Промежуточная мезодерма куриного зародыша приобретает способность формировать почки благодаря взаимодействию с параксиальной мезодермой. Хотя предрасположенность к формированию промежуточной мезодермы, вероятно, устанавливается с помощью градиента BMP, ее спецификация, очевидно, стабилизируется с помощью сигналов параксиальной мезодермы. Показано, что сигналы от параксиальной мезодермы вызывают формирование первичной почки в промежуточной мезодерме куриного зародыша (Mauch et al., 2000). В этих экспериментах развивающийся зародыш рассекали таким образом, что на одной стороне тела промежуточная мезодерма не могла контактировать с параксиальной мезодермой. На той стороне тела, где контакт промежуточной мезодермы с параксиальной был прерван, почки не развивались, а неповрежденная сторона сохра-

няла способность их формировать (рис. 18.3А, Б). Следовательно, параксиальная мезодерма необходима и достаточна для индукции промежуточной мезодермы к формированию почек. В подтверждение этого в экспериментах по совместному культивированию показано, что параксиальная мезодерма может инициировать образование пронефрических канальцев даже из мезодермы боковой пластинки. Ни один другой тип клеток не обладает такими индуктивными способностями. Описанные взаимодействия индуцируют экспрессию ряда гомеодоменных транскрипционных факторов, включая *Lim1* (иногда называемый *Lhx1*), *Pax2* и *Pax8*, которые и заставляют промежуточную мезодерму формировать почку (рис. 18.3В; Karavanov et al., 1998; Kobayashi et al., 2005; Cirio et al., 2011). У куриного зародыша *Pax2* и *Lim1* экспрессируются в промежуточной мезодерме, начиная с уровня шестого сомита (т. е. только в туловище, но не в голове). Если экспериментально индуцировать *Pax2* в пресомитной мезодерме, он превращает эту ткань в промежуточную мезодерму, заставляя ее экспрессировать *Lim1* и формировать почку (Mauch et al., 2000; Suetsugu et al., 2005). Схожим образом у мышиных зародышей, нокаутных одновременно по двум генам (*Pax2* и *Pax8*), нарушается мезенхимо-эпителиальный переход, необходимый для образования почечного протока, так что клетки подвергаются апоптозу и структура почек не образуется (Bouchard et al., 2002). Более того, у мышей *Lim1* и *Pax2*, по-видимому, индуцируют друг друга.

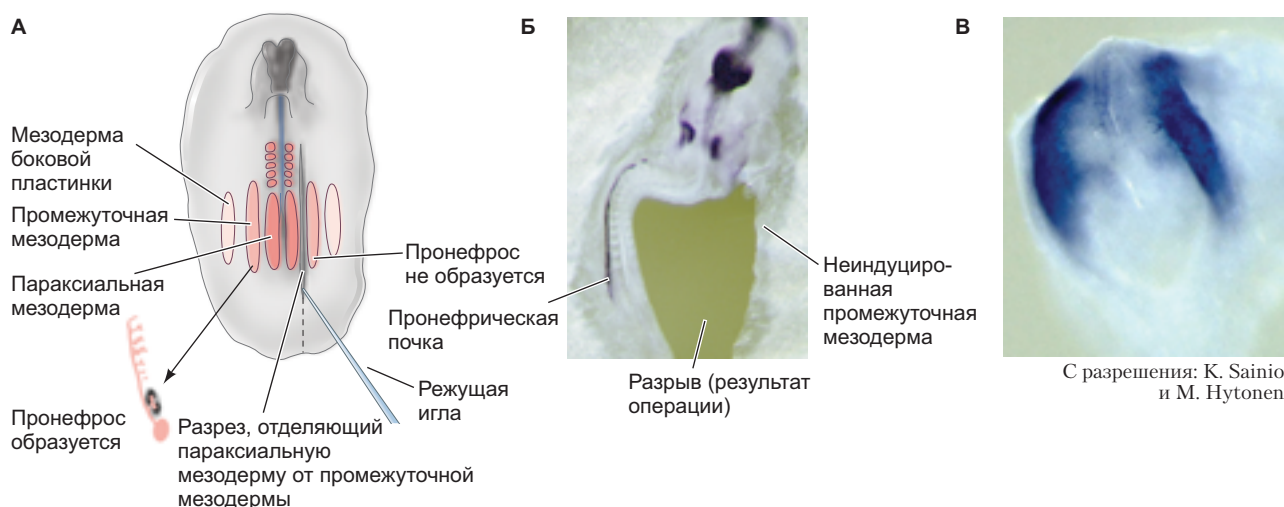
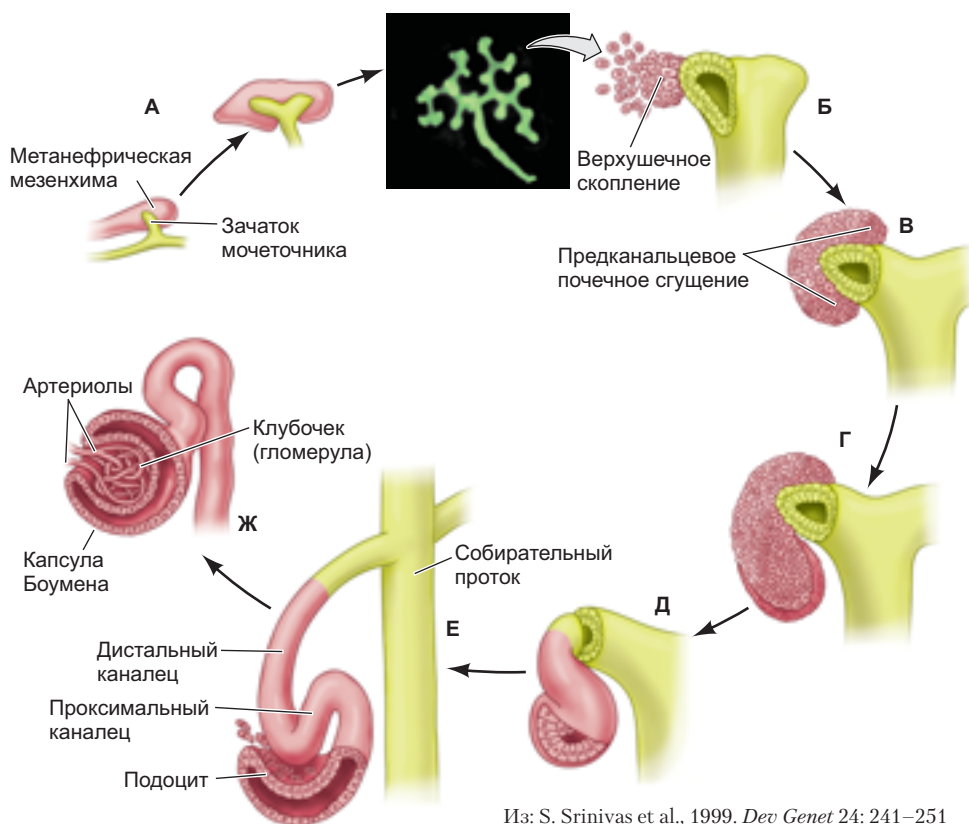


Рис. 18.3. Сигналы, идущие из параксиальной мезодермы, индуцируют формирование пронефроса в промежуточной мезодерме куриного зародыша. **А.** Схема операции по отделению параксиальной мезодермы от промежуточной мезодермы с правой стороны тела. **Б.** В результате пронефрическая почка (экспрессия *Pax2* в протоке) формируется только на левой стороне. **В.** Экспрессия *Lim1* у восьмидневного мышиного зародыша, маркирующая перспективную промежуточную мезодерму. (Рис. А, Б по данным: T. J. Mauch et al., 2000. *Dev Biol* 220: 62–75.)

Реципрокные взаимодействия тканей развивающейся почки

Почка амниот имеет тот тип, что и у нас с вами, и образуется из двух различных популяций клеток-предшественников, происходящих из промежуточной мезодермы — зачатка мочеточника и метанефрической мезенхимы. Зачаток мочеточника формирует все типы клеток, которые составляют зрелые собирательные протоки и мочеточник, в то время как метанефрическая мезенхима дает начало всем типам клеток зрелого нефрона, а также некоторым сосудистым и стромальным производным. Эти две группы клеток — зачаток мочеточника и метанефрическая мезенхима — взаимодействуют и реципрокно индуцируют друг друга, чтобы сформировать почку (рис. 18.4). Метанеф-

рогенная мезенхима заставляет зачаток мочеточника удлиняться и ветвиться. Кончики его ветвей индуцируют рыхло лежащие клетки мезенхимы к образованию предканальцевых почечных сгущений. В каждом из таких агрегатных узелков идет пролиферация и дифференцировка в сложную структуру почечного нефрона. Каждый предканальцевый агрегат сначала претерпевает мезенхимо-эпителиальный переход, становясь поляризованным почечным пузырьком. Позднее почечный пузырек удлиняется, принимая форму запятой (или буквы С), а затем преобразуется в характерную S-образную трубочку. Вскоре клетки этой эпителиальной структуры начинают дифференцироваться в региональноспецифичные типы клеток, включая клетки капсулы Боумена — подоциты, а также дистальные и проксимальные клетки канальца. Во время этого превращения клетки S-образного



Из: S. Srinivas et al., 1999. *Dev Genet* 24: 241–251

Рис. 18.4. Реципрокная индукция в ходе развития почки млекопитающих. **А.** Как только зачаток мочеточника входит в метанефрическую мезенхиму, она индуцирует его ветвление. **Б–Ж.** Эпителий на вершинах веточек зачатка мочеточника индуцирует мезенхиму к агрегации и кавитации, ведущей к формированию почечных канальцев и клубочков (в которых фильтруется кровь артериол). После конденсации мезенхимы в эпителий его клетки разрушают базальную мембрану зачатка мочеточника и соединяются с его эпителием. Часть агрегировавшей мезенхимы (предканальцевое сгущение) дает нефрон (почечные канальцы и капсулу Боумена), а зачаток мочеточника становится протоком, собирающим мочу. (По данным: L. Saxén, 1984. In *Modern Biological Experimentation*, ed. C. Chagas, pp. 155–163. Pontificia Academia Scientiarum. Città del Vaticano; H. Sariola, 2002. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11: 17–21.)

канальца, примыкающие к зачатку мочеточника, разрушают базальную пластинку эпителия зачатка мочеточника и мигрируют в область протока. В результате зачаток мочеточника и новообразованный каналец нефрона соединяются, обеспечивая прохождение материала из одного канала в другой (Bard et al., 2001; Kao et al., 2012). Канальцы, образовавшиеся из мезенхимы, формируют нефроны функциональной почки, а разветвленный зачаток мочеточника дает начало почечным собирающим протокам и мочеточнику, который выводит мочу из почки.

Эта взаимная индукция показана *in vitro* (Grobstein 1955, 1956). Отделив зачаток мочеточника от метанефрогенной мезенхимы, их культивировали раздельно либо вместе. Без мезенхимы зачаток мочеточника не ветвился. В отсутствие зачатка мочеточника мезенхима вскоре погибала. Однако в случае совместного культивирования зачаток мочеточника рос и ветвился, а нефроны формировались по всей мезенхиме. Это было подтверждено экспериментами с использованием GFP-меченых белков для прослеживания клеточных делений и ветвления (рис. 18.5; Srinivas et al., 1999).

Механизмы реципрокной индукции

Индукцию метанефроза можно представить себе в виде диалога между зачатком мочеточника и метанефрогенной мезенхимой. В процессе диалога изменяются обе ткани. Мы станем свидетелями этого взаимодействия, ставшего моделью для изучения органогенеза (Costantini, 2012; Krause et al., 2015a). Уже открыто много паракринных факторов, вызывающих взаимную индукцию почечного нефрона и его собирательных протоков, и есть свидетельства (Krause et al., 2015b), что эти белки упакованы в виде экзосом, содержимое которых может быть сконцентрировано на соседних клетках.

ЭТАП 1: ФОРМИРОВАНИЕ МЕТАНЕФРОГЕННОЙ МЕЗЕНХИМЫ И ЗАЧАТКА МОЧЕТОЧНИКА

Метанефрогенная мезенхима и зачаток мочеточника имеют гораздо больше общего, чем может показаться. Они оба происходят из промежуточной мезодермы и оба развиваются под контролем сигнальных путей Wnt и FGF. Эпителий мочеточника происходит из рано мигрирующей промежуточной мезодермы, которая подвергается кратковременному действию сигналов Wnt, а затем испытывает на себе более продолжительное влияние задних сигналов Fgf9 и ретиноевой кислоты. Клетки, становящиеся метанефрогенной мезенхимой, мигрируют через первичную полосу позже и, таким образом, подвергаются воздействию сигналов Wnt гораздо дольше. Затем они испытывают сигналы FGF и ретиноевой кислоты (рис. 18.6А, Б; Takasato et al., 2015), индуцирующие ряд транскрипционных факторов, что позволяет метанефрогенной мезенхиме реагировать на зачаток мочеточника. Только метанефрогенная мезенхима компетентна отвечать на сигналы зачатка мочеточника и формировать почечные канальцы (Saxén, 1970; Sariola et al., 1982).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ОРГАНОИД ПОЧКИ

Когда индуцированные плюрипотентные стволовые (iPSC) клетки человека последовательно культивируют в активаторах Wnt- и FGF-путей, они превращаются либо в эпителий мочеточника, либо в метанефрогенную мезенхиму. Как и в эмбриогенезе, специфичность дифференцировки зависит от продолжительности воздействия каждого фактора. Еще более примечательно, что, когда эти типы клеток культивируют вместе, образуются органоиды, напоминающие почку (рис. 18.6В; Takasato and Little, 2015). Хотя органоиды не содержат сложных структур наподобие нефрона, в них образуются основные клеточные типы нефрона и собирательных протоков.

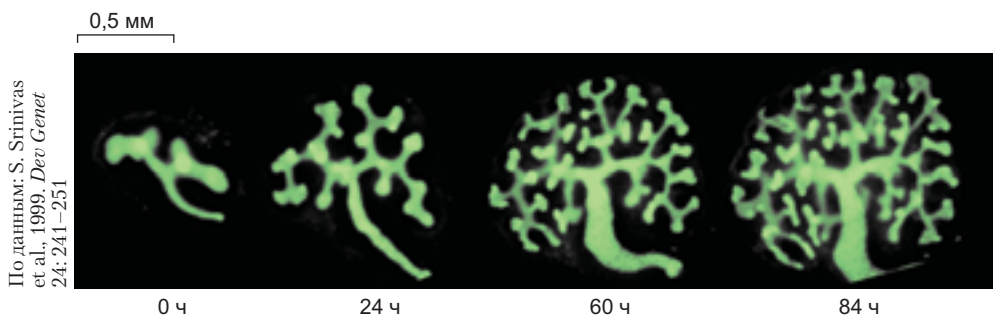


Рис. 18.5. Ветвление в почке, наблюдаемое *in vitro*. Зачаток почки 11,5-дневного мышинного зародыша помещен в культуру. У этой трансгенной мыши ген *GFP* присоединен к промотору *Hoxb7*, что обеспечивает экспрессию зеленого флуоресцентного белка в вольфовом (почечном) протоке и в зачатках мочеточника. Визуализация GFP в живых тканях позволяет пронаблюдать развитие почки в реальном времени

ЭТАП 2: МЕТАНЕФРОГЕННАЯ МЕЗЕНХИМА ИНДУЦИРУЕТ РОСТ ЗАЧАТКА МОЧЕТОЧНИКА

Далее приходит время для секреции паракринных факторов, которые могут индуцировать появление зачатков мочеточника. **Глиальный нейротрофический фактор (GDNF)**, секретируемый метанефрогенной мезенхимой, вызывает развитие зачатка мочеточника только из тех клеток почечного протока, которые экспрессируют Ret — рецептор GDNF (рис. 18.7).

ЭТАП 3: ЗАЧАТОК МОЧЕТОЧНИКА ПРЕДОТВРАЩАЕТ АПОПТОЗ В МЕЗЕНХИМЕ

Третий сигнал в развитии почек поступает из зачатка мочеточника в метанефрогенную мезенхиму. Эти факторы секретируются зачатком мочеточника и включают в себя Fgf2, Fgf9 и BMP7. Без индуктивного влияния от зачатка мочеточника мезенхимные клетки подвергаются апоптозу (Grobstein, 1955; Koseki et al., 1992). Однако после сигнала клетки мезенхимы спасаются от смертельной угрозы и пре-

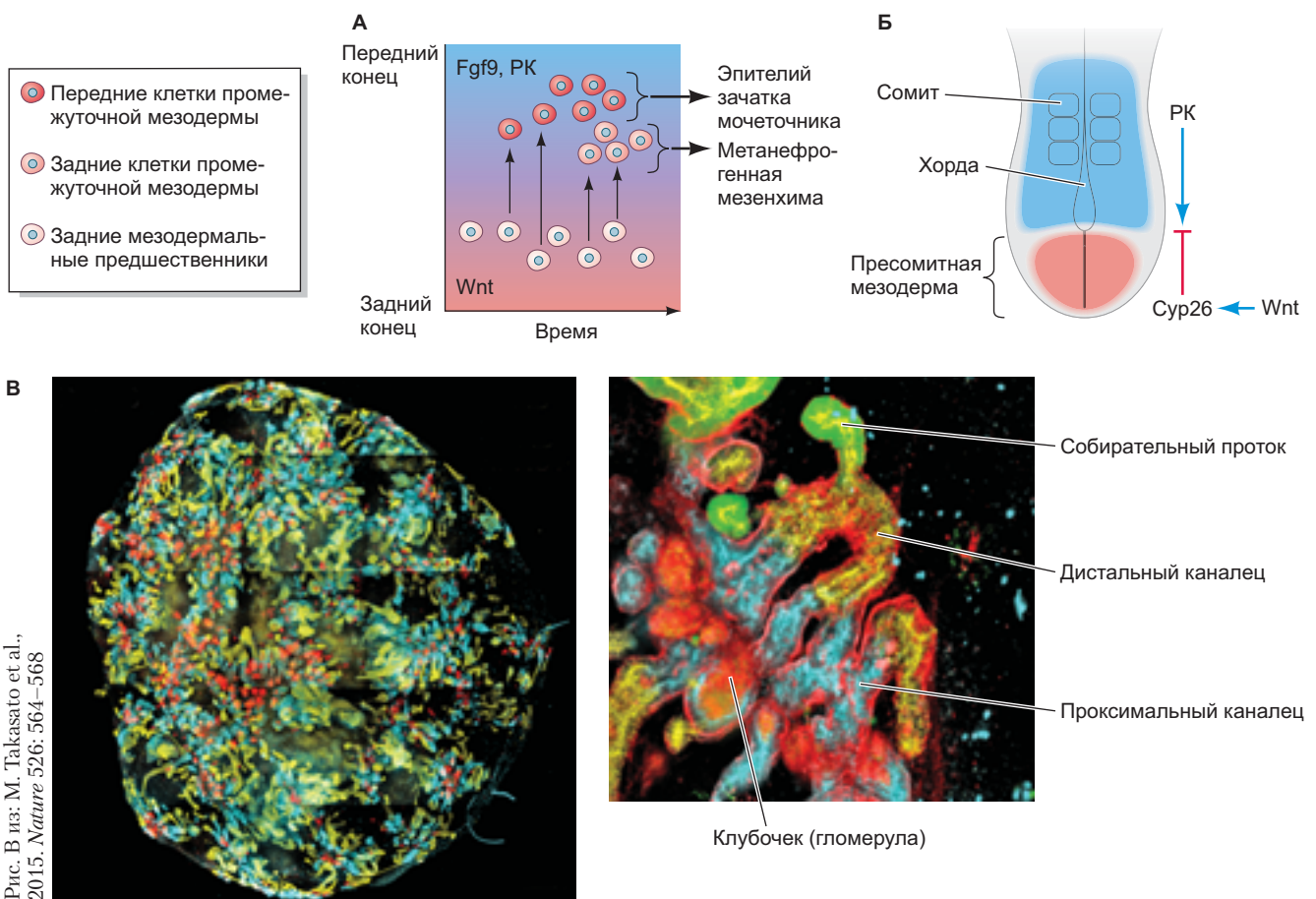
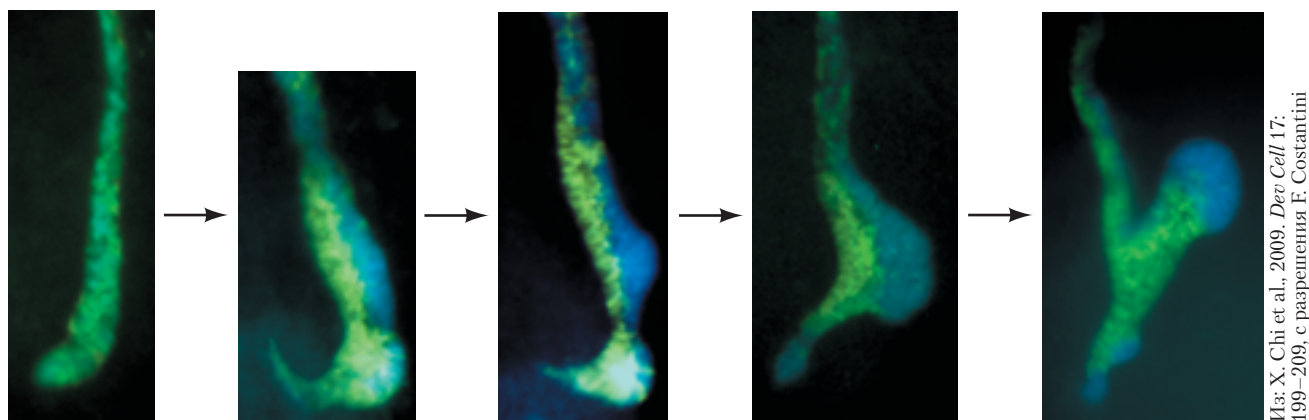


Рис. В из: M. Takasato et al., 2015. *Nature* 526: 564–568

Рис. 18.6. Создание органоидов почки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. **А.** Механизм спецификации зачатка мочеточника и метанефрогенной мезодермы из задних мезодермальных клеток-предшественников. Те клетки-предшественники, которые мигрируют из задней мезодермы на ранних стадиях гаструляции, покидают зону влияния Wnt и направляются в области большого количества FGF и ретиноевой кислоты (РК). В результате они определяют свое развитие как будущий эпителий зачатка мочеточника. А те клетки, которые мигрируют позже, дольше оставаясь в области доминирования Wnt, становятся предшественниками метанефрогенной мезенхимы. **Б.** RA-сигналинг на стадии поздней первичной полоски. Благодаря Wnt фермент Cyp26, разрушающий RA, экспрессируется в области пресомитной мезодермы, что защищает задние мезодермальные клетки-предшественники (PMP) от РК-сигналинга. **В.** Иммунофлуоресцентный микроскопический анализ органоида почки, образованного из iPSC человека, на которые последовательно воздействовали стимуляторами Wnt и FGF. На врезке справа представлено большое увеличение нефрона, разделенного на четыре сегмента: собирающий проток (зеленый), дистальный (желтый) и проксимальный (голубой) каналцы, а также клубочек (красный). (По данным: M. Takasato et al., 2015. *Nature* 526: 564–568.)



Из: X. Chi et al., 2009, *Dev Cell* 17: 199–209, с разрешения F. Costantini

Рис. 18.7. Рост зачатка мочеточника зависит от GDNF и его рецепторов. У мышей, которые состоят из клеток, лишенных Ret (зеленый) и Ret-экспрессирующих клеток (синий), только обладающие этим рецептором клетки мигрируют и формируют кончик зачатка мочеточника

вращаются в пролиферирующие стволовые клетки (Bard and Ross, 1991; Bard et al., 1996).

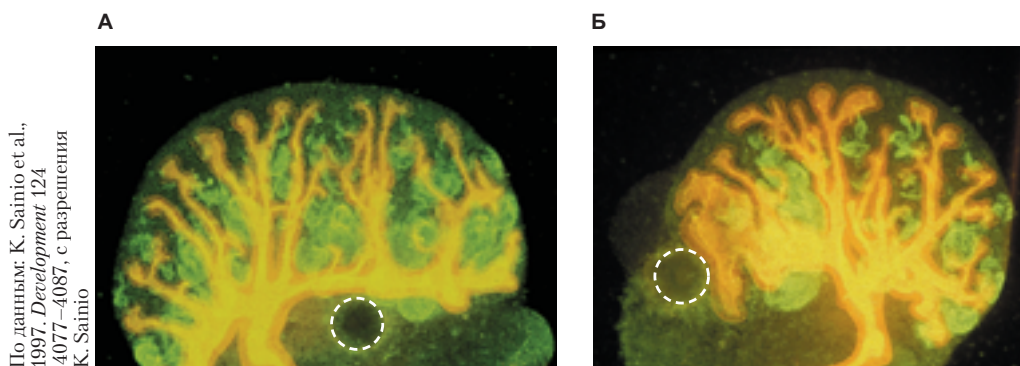
ЭТАП 4: МЕЗЕНХИМА ИНДУЦИРУЕТ ВЕТВЛЕНИЕ ЗАЧАТКА МОЧЕТОЧНИКА

Лиганды GDNF и Wnt из мезенхимы, а также другие паракринные факторы (FGF и BMP) все вместе вовлечены в регуляцию ветвления зачатка мочеточника и, вероятно, действуют по принципу «тяги-толкай» на процессы деления клеток и внеклеточный матрикс (Ritvos et al., 1995; Miyazaki et al., 2000; Lin et al., 2001; Majumdar et al., 2003). GDNF не только индуцирует первоначальное ответвление зачатка мочеточника от почечного протока, но и может вызывать вторичное ветвление зачатка мочеточника после его вставания в мезенхиму (рис. 18.8; Sainio et al., 1997; Shakya et al., 2005; Chi et al., 2008). GDNF индуци-

рует и синтез Wnt11 в воспринимающих его клетках на кончике зачатка (рис. 18.9А), а Wnt11 в ответ регулирует уровни GDNF (Majumdar et al., 2003; Kuure et al., 2007). Взаимодействие путей GDNF/Ret и Wnt, по-видимому, поддерживает баланс между ветвлением эпителия и пролиферацией метанефrogenной мезенхимы, обеспечивая непрерывное развитие почек. Таким образом происходит поддержание двух групп стволовых клеток: **концевых клеток зачатка мочеточника** и **верхушечных клеток мезенхимы** (Mugford et al., 2009; Barak et al., 2012).

ЭТАП 5: СИГНАЛЫ WNT ПРЕВРАЩАЮТ АГРЕГИРОВАННЫЕ КЛЕТКИ МЕЗЕНХИМЫ В НЕФРОН

Wnt9b и Wnt6 из зачатка мочеточника критически важны для превращения мезенхимных клеток нефро-



По данным: K. Sainio et al., 1997, *Development* 124: 4077–4087, с разрешения K. Sainio

Рис. 18.8. Влияние GDNF на ветвление мочеточникового эпителия. Зачаток мочеточника и его ветви окрашены в **оранжевый** цвет (антителами к цитокератину 18), а нефроны — в **зеленый** (антителами к антигенам щеточной каемки нефрона). **А.** Почка 13-дневного мышиноного зародыша после культивации в течение 2 дней с контрольной бусиной (пунктир) имеет нормальный характер ветвления. **Б.** Почка того же возраста после 2 дней культивации с бусиной, пропитанной GDNF, имеет аномальное строение, поскольку вблизи бусины возникают новые ветви

Рис. 18.9. Важность Wnt для развития почек.

А. В 11-дневной почке мыши Wnt9b обнаружен в стволе зачатка мочеточника, в то время как Wnt11 экспрессируется на его дистальных окончаниях. Wnt9b вызывает конденсацию метанефрической мезенхимы; Wnt11 размечает метанефрическую мезодерму на части, чтобы индуцировать ветвление зачатка мочеточника. Границы зачатка обозначены пунктирной линией.

Б. Самец 18,5-дневной мыши дикого типа (*слева*) имеет нормальные почки, надпочечники и мочеточники. У мышей с утраченным Wnt9b (*справа*) почки отсутствуют

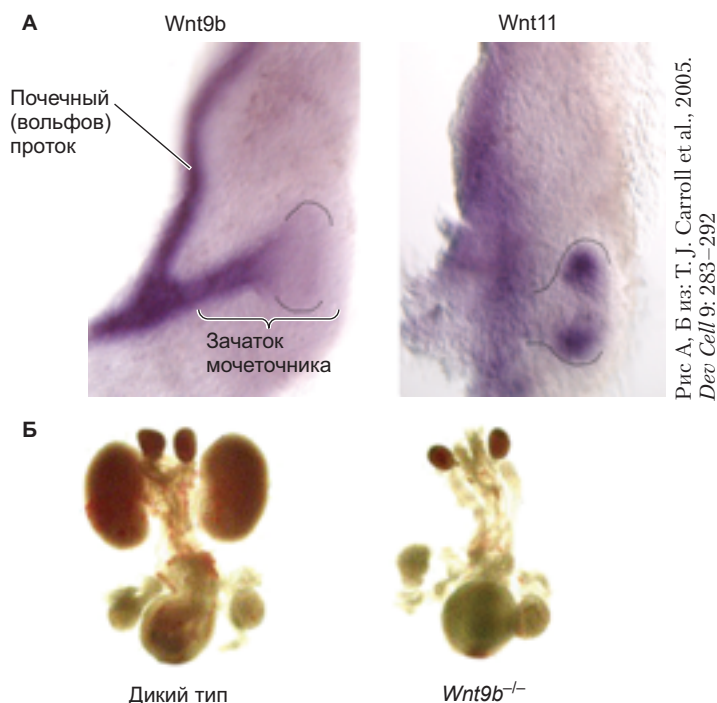


Рис. А, Б из: Т. J. Carroll et al., 2005. *Dev Cell* 9: 283–292

на в трубчатый эпителий. Эти паракринные сигналы индуцируют еще один Wnt в мезенхиме — Wnt4. Он действует аутокринным способом для завершения перехода от мезенхимной массы к эпителию (рис. 18.9; Stark et al., 1994; Kispert et al., 1998; Itäranta et al., 2002).

Из эпителия образуется почечный пузырек с полостью, который сразу становится поляризованным в проксимально-дистальном направлении (от зачатка мочеточника до будущей капсулы). Комбинация сигнальных факторов (в особенности белков Notch) обеспечивает дифференциальную экспрессию генов вдоль всего нового эпителия. По мере того как эпителий изменяет свою форму, образуя С- и S-образные каналы, происходит спецификация частей нефрона (Georgas et al., 2009). Механизм объединения нефрона с зачатком мочеточника остается неясным.

ЭТАП 6: ВСТРАИВАНИЕ МОЧЕТОЧНИКА В МОЧЕВОЙ ПУЗЫРЬ

Ветвящийся эпителий зачатка мочеточника становится собирательной системой почки. Этот эпителий выстилает пути вывода отфильтрованной мочи из нефрона и выделяет антидиуретический гормон для реабсорбции воды (данный процесс, ни много ни мало, делает возможной жизнь на суше). Первоначальный ствол зачатка мочеточника, расположенный между первой точкой ветвления и Вольфовым протоком, становится мочеточником — трубкой, по которой моча попадает в мочевой пузырь. Соединение между мочеточником и мочевым пузырем чрезвычайно важно, ведь, если оно неправильно расположено и моча

не может попасть в мочевой пузырь, развивается гидронефроз — врожденный дефект, приводящий к нарушениям почечной фильтрации.

Благодаря конденсации мезенхимных клеток вокруг мочеточника он превращается в водонепроницаемый соединительный канал. Внешние мезенхимные элементы становятся гладкомышечными клетками, способными к волнообразным сокращениям (перистальтике), что позволяет моче перемещаться в мочевой пузырь. Эти же клетки секретируют ВМР4 (Sebrian et al., 2004), который обеспечивает дифференцировку соответствующей области зачатка в мочеточник. Ингибиторы ВМР защищают области зачатка мочеточника, образуя собирательные протоки, от этой дифференцировки.

Для завершения развития выделительной системы мочеточник должен установить связь с мочевым пузырем, происходящим из энтодермы. Мочевой пузырь развивается из части **клоака**¹ — органа, принимающего отходы как из кишечника, так и из почек (рис. 18.10А, Б). У млекопитающих клоака разделена перегородкой на урогенитальный (мочеполовой) синус и прямую кишку. Одна часть урогенитального синуса и дает начало мочевому пузырю, а другая становится мочеиспускательным каналом, выводящим мочу из организма.

Зачаток мочеточника растет к мочевому пузырю под контролем эфринавого пути (Weiss et al., 2014). Будучи в составе мочевого пузыря, клетки урогенитального синуса как бы обрастают проксималь-

¹ Термин «клоака» в переводе с латинского означает «сточная труба» — плохая (но все же смешная) шутка ранних европейских анатомов.

ные концы мочеточника и почечного (вольфового) протока. Затем конец почечного протока сдвигается вентрально, открываясь уже в мочеиспускательный канал (уретру), а не в мочевой пузырь (рис. 18.10В–Е). В ходе дальнейшего разрастания мочевого пузыря мочеточник перемещается в свое окончательное положение на шейке мочевого пузыря (Batourina et al., 2002; Mendelsohn, 2009). У самок весь почечный проток дегенерирует, а Мюллеров проток открывается во влагалище (см. гл. 6). У самцов почечный проток

служит для выведения спермы, вследствие чего ее выделение наружу происходит через одно и то же отверстие, что и выделение мочи.

Таким образом, фильтрующие кровь (тазовые) почки возникают в результате взаимной индукции двух частей промежуточной мезодермы — зачатка мочеточника и метанефрогенной мезенхимы. Теперь мы можем пойти еще дальше в сторону и сосредоточиться на мезодерме боковой пластинки, чтобы рассмотреть генезис сердца, сосудов и крови.

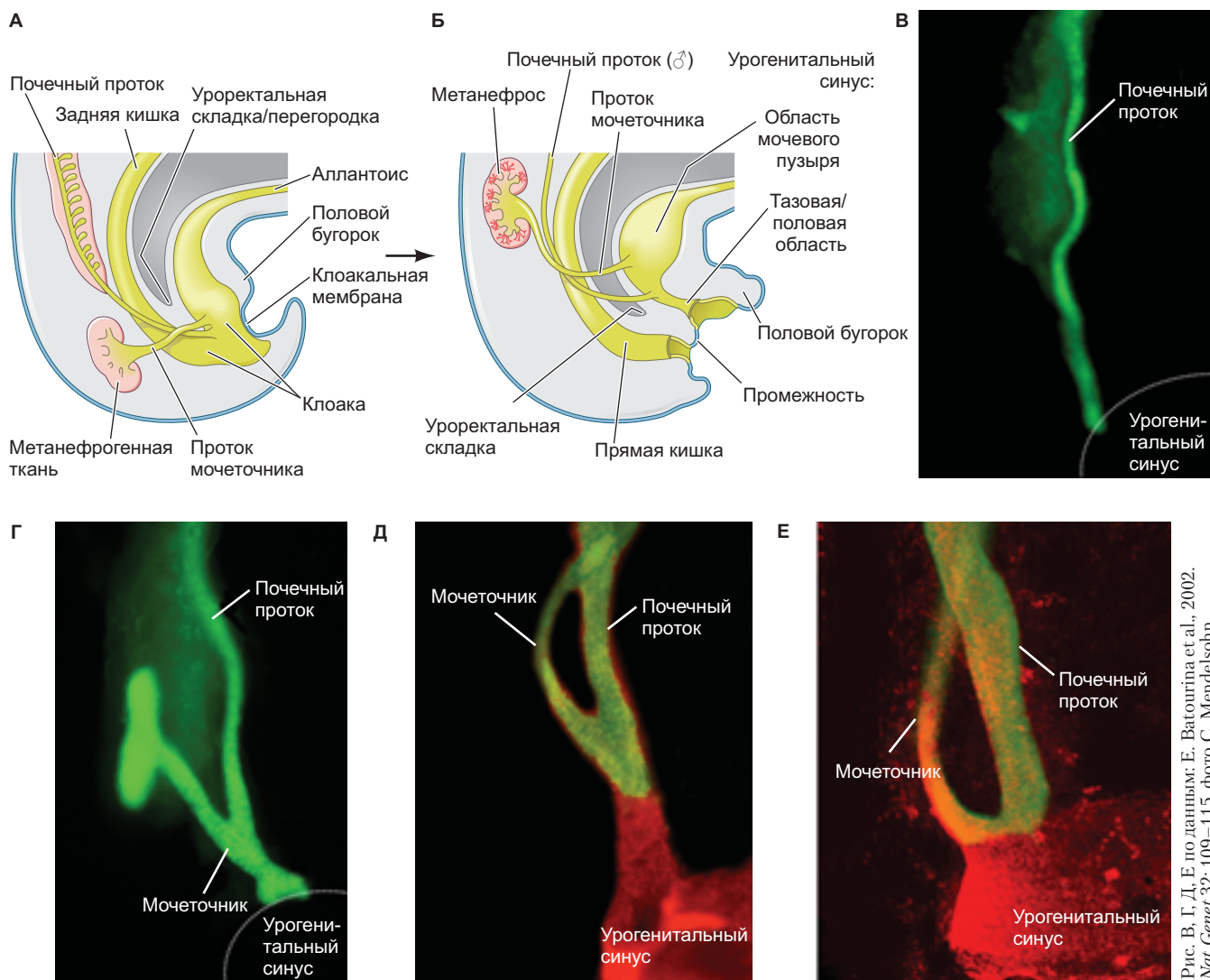


Рис. В, Г, Д, Е по данным: E. Batourina et al., 2002. *Nat Genet* 32: 109–115; фото С. Mendelsohn

Рис. 18.10. Развитие мочевого пузыря и его связь с почкой через мочеточник. **А.** Клоака возникает из энтодермы как место сбора отходов и открывается в аллантаис. **Б.** Уроректальная перегородка делит клоаку на будущую прямую кишку и урогенитальный синус. Мочевой пузырь формируется из передней части синуса, а мочеиспускательный канал — из задней. Пространство между анальным и мочеиспускательным отверстием называют промежностью. **В–Е.** Сочленение мочеточника и мочевого пузыря у мышиного зародыша. **В.** Мочеполовая система 10-дневного мышиного зародыша. Почечный проток визуализирован с помощью экспрессии GFP (зеленый) под промотором *Hoxb7*. **Г.** На 11-й день эмбрионального развития в мочеполовой системе появляется зачаток мочеточника. **Д.** Препарат мочеполовой системы 12-дневного зародыша. Протоки окрашены в зеленый цвет, урогенитальный синус — в красный. **Е.** Мочеточник отделяется от почечного протока и открывается в мочевой пузырь через собственное отверстие. (Рис. А, Б по данным: L. R. Cochard, 2002. *Netter's Atlas of Human Embryology*. MediMedia USA: Peterboro, NJ.)

Мезодерма боковой пластинки: сердце и кровеносная система

Кровеносная система, включая сердце, клетки крови и сложнейшую сеть сосудов, является первым функционирующим модулем зародыша позвоночного, обеспечивающим питание развивающегося организма. Немногие биологические процессы так наглядны, как биение сердца у двухдневного куриного зародыша. Это сердце закачивает самые первые кровяные клетки в сосуды, в которых еще даже не образовались клапаны. В 1651 г. среди хаоса гражданских войн в Англии королевский врач Вильям Гарвей находил покой в созерцании сердца — абсолютного правителя тела, на божественно предписанной власти которого основан закономерный рост всего организма. Позднее эмбриологи усматривали в сердце не правителя, а скорее слугу, домоуправителя, который гарантирует, что питательные вещества достигнут и мозга, и периферических мышц. В каждой из метафор сердцу и кровообращению (которое было открыто

Гарвеем) отводилась ведущая роль в развитии. Гарвей настоятельно подчеркивал (Harvey, 1651), что куриный зародыш создает свою кровь сам, без помощи курицы, и эта кровь имеет решающее значение для эмбрионального роста. Как именно осуществляются эти процессы, было для него загадкой.

Сердце и система кровообращения, столь привлекавшие Гарвея, возникают у зародыша позвоночного из мезодермы боковой пластинки. Эта часть мезодермы лежит по бокам от полос промежуточной мезодермы (см. рис. 18.1). Каждая из боковых пластинок мезодермы подразделяется в горизонтальной плоскости на два слоя. Дорсальный листок называют **соматической (париетальной) мезодермой**, она подстилает эктодерму и вместе с ней образует **соматоплевру**. Вентральный листок называют **спланхнической (висцеральной) мезодермой**, она примыкает к энтодерме снаружи и вместе с энтодермой образует **спланхноплевру** (рис. 18.11А). Пространство между двумя листками становится полостью тела — целомом, простирающимся от области шеи к заднему концу тела.

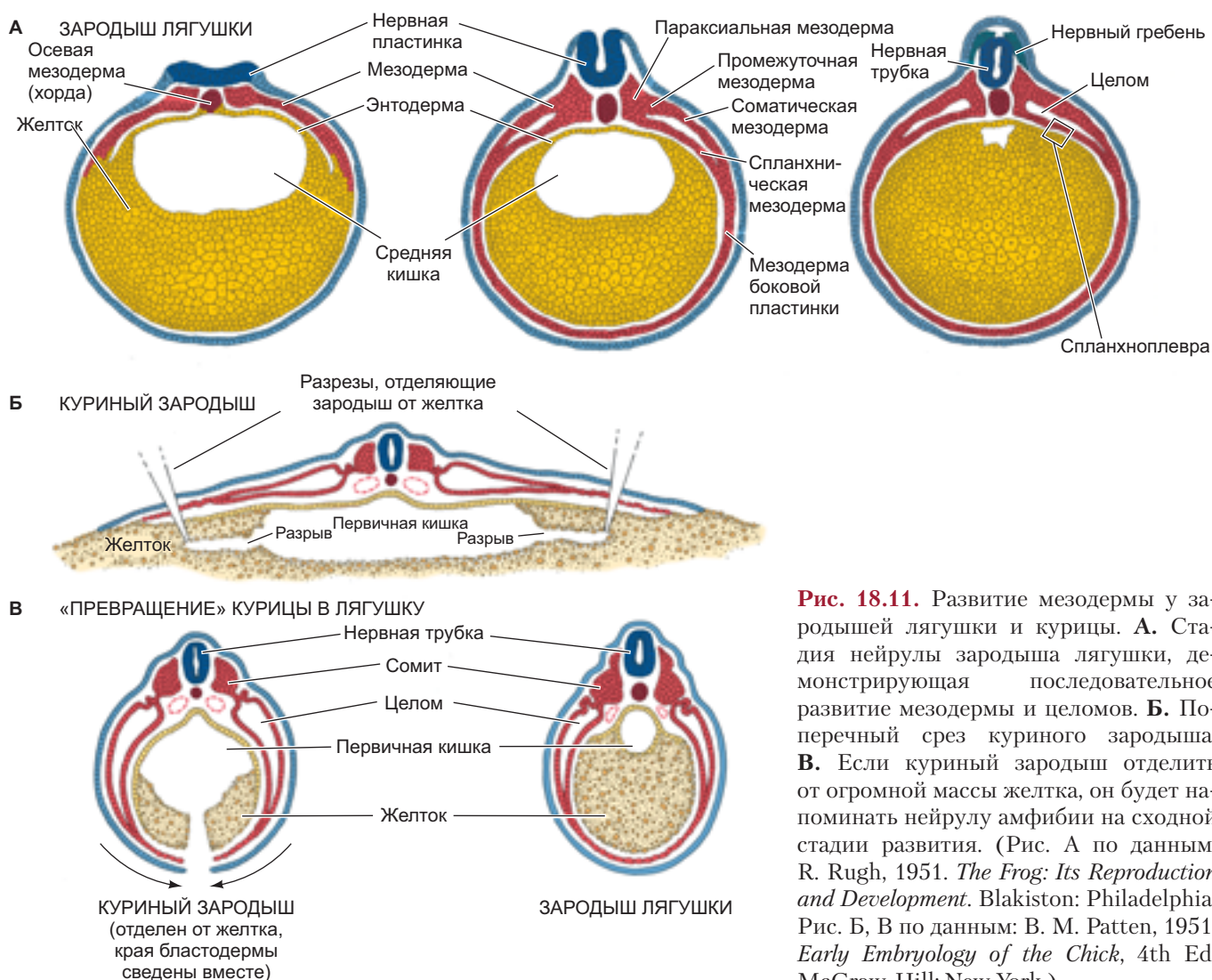


Рис. 18.11. Развитие мезодермы у зародышей лягушки и курицы. **А.** Стадия нейрулы зародыша лягушки, демонстрирующая последовательное развитие мезодермы и целома. **Б.** Поперечный срез куриного зародыша. **В.** Если куриный зародыш отделить от огромной массы желтка, он будет напоминать нейрулу амфибии на сходной стадии развития. (Рис. А по данным: R. Rugh, 1951. *The Frog: Its Reproduction and Development*. Blakiston: Philadelphia; Рис. Б, В по данным: B. M. Patten, 1951. *Early Embryology of the Chick*, 4th Ed. McGraw-Hill: New York.)

В ходе дальнейшего развития целомы правой и левой сторон сливаются, а складки соматической мезодермы разделяют целом на независимые полости. У млекопитающих складки делят целом на **плевральную, перикардальную и перитонеальную** полости, в которых заключены соответственно грудь, сердце и живот. Механизм формирования выстилок этих полостей тела из мезодермы боковых пластинок мало изменился в процессе эволюции позвоночных, поэтому развитие мезодермы амниот можно легко сопоставить с аналогичными стадиями ее развития у лягушки (рис. 18.11Б, В). Развитие системы кровообращения дает замечательные примеры индукции, спецификации, миграции клеток, формирования органов и роли стволовых клеток как в эмбриональном развитии, так и в регенерации взрослых тканей.

Развитие сердца

Система кровообращения — первая функциональная единица развивающегося зародыша, а сердце — первый функциональный орган. Как и другие органы, сердце возникает в результате спецификации клеток-предшественников, миграции их к месту закладки органа, спецификации клеточных типов посредством сигнальных взаимодействий внутри и между тканями и координации морфогенеза, роста и клеточной дифференцировки.

Миниатюрное сердце

И у птиц, и у млекопитающих сердце представляет собой сложную, довольно причудливую структуру. Однако в ходе эволюции амниот оно появилось

из гораздо более простых насосов (Stolfi et al., 2010). Четырехкамерный шедевр, коим является сердце млекопитающего, вполне можно трактовать как усовершенствованное развитие однокамерного сердца оболочников, которое образуется всего из двух десятков клеток. У оболочников (одних из ближайших беспозвоночных родственников позвоночных; см. гл. 10) кардиогенные предшественники образуют билатеральные клеточные кластеры, которые мигрируют вдоль энтодермы вперед и вентрально, сливаясь по вентральной средней линии (рис. 18.12; Davidson et al., 2005). Те немногие клетки, которые образуют сердце оболочников, по всей видимости, имеют такой же базовый набор факторов транскрипции, который мы наблюдаем в сердечных клеточных линиях у кур и мышей.

Формирование полей сердца

В то время как зародыши оболочников развиваются быстро и из небольшого числа клеток, сердце позвоночных возникает из двух доменов спланхической мезодермы — по одному на каждой стороне тела, которые взаимодействуют с соседней тканью, чтобы специфицироваться для развития сердца.

Клетки-предшественники сердца (у мышей их около 50) расположены у ранней гастролы амниот в двух небольших участках, по одному на каждой стороне эпибласта, рядом с ростральной частью первичной полоски. Они совместно мигрируют через полосу и образуют две группы клеток мезодермы боковой пластинки, расположенные спереди на уровне узелка (Tam et al., 1997; Colas et al., 2000). Общая спецификация **кардиогенного (сердечного) поля**, известного также как **кардиогенная мезодерма**, начинается уже во время миграции. Эксперименты по маркировке (Stalberg and DeHann, 1969; Abu-Issa and Kirby, 2008)

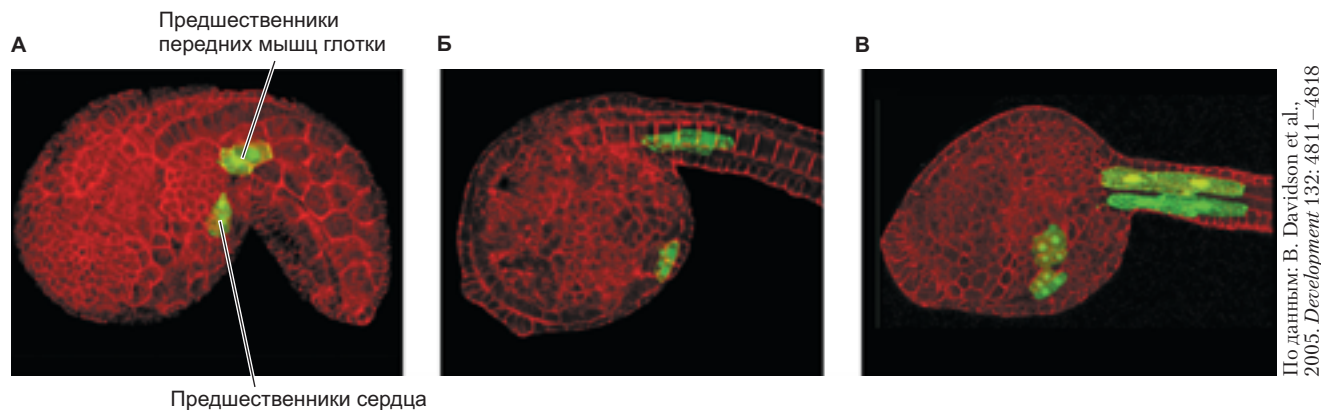


Рис. 18.12. Развитие сердца у асидии *Ciona*. **А.** У зародышей на стадии хвостовой почки трансгенный Mesp-GFP (зеленый) появляется в областях, где Tbx6 активирует Mesp в бластомерах B8.9 и B8.10. **Б.** На более продвинутой стадии предшественники сердца мигрируют в область головы. **В.** Вентрально-латеральная проекция, на которой можно наблюдать как левые, так и правые предшественники сердца и других мышц. И сердце (слева) и передние мышцы формируются в результате клеточных делений

По данным: B. Davidson et al., 2005. *Development* 132: 4811–4818

показали, что клетки-предшественники сердечного поля мигрируют так, что медиально-латеральное (от центра в сторону) расположение этих ранних клеток соответствует передне-задней (роstralно-каудальной) оси прямолинейной **сердечной трубки**.

Кардиогенная мезодерма позвоночных состоит, по меньшей мере, из двух областей (**рис. 18.13**). Считается, что первичное кардиогенное поле формирует остов развивающегося сердца. Клетки-предшественники поля сливаются по средней линии, образуя первичную сердечную трубку, дающую начало мы-

шечным областям левого и правого желудочков (de la Cruz and Sanchez-Gomez, 1998). Однако эти клетки имеют ограниченный пролиферативный потенциал, вследствие чего производят только большую часть левого желудочка взрослого сердца (ту камеру, которая перекачивает кровь в аорту). Предшественники вторичного кардиогенного поля добавляют клеточный материал как к переднему, так и к заднему концам сердечной трубки (Meilhac et al., 2015). Сзади эти клетки образуют предсердия (у рыб одно, а у всех остальных позвоночных два) и вносят вклад

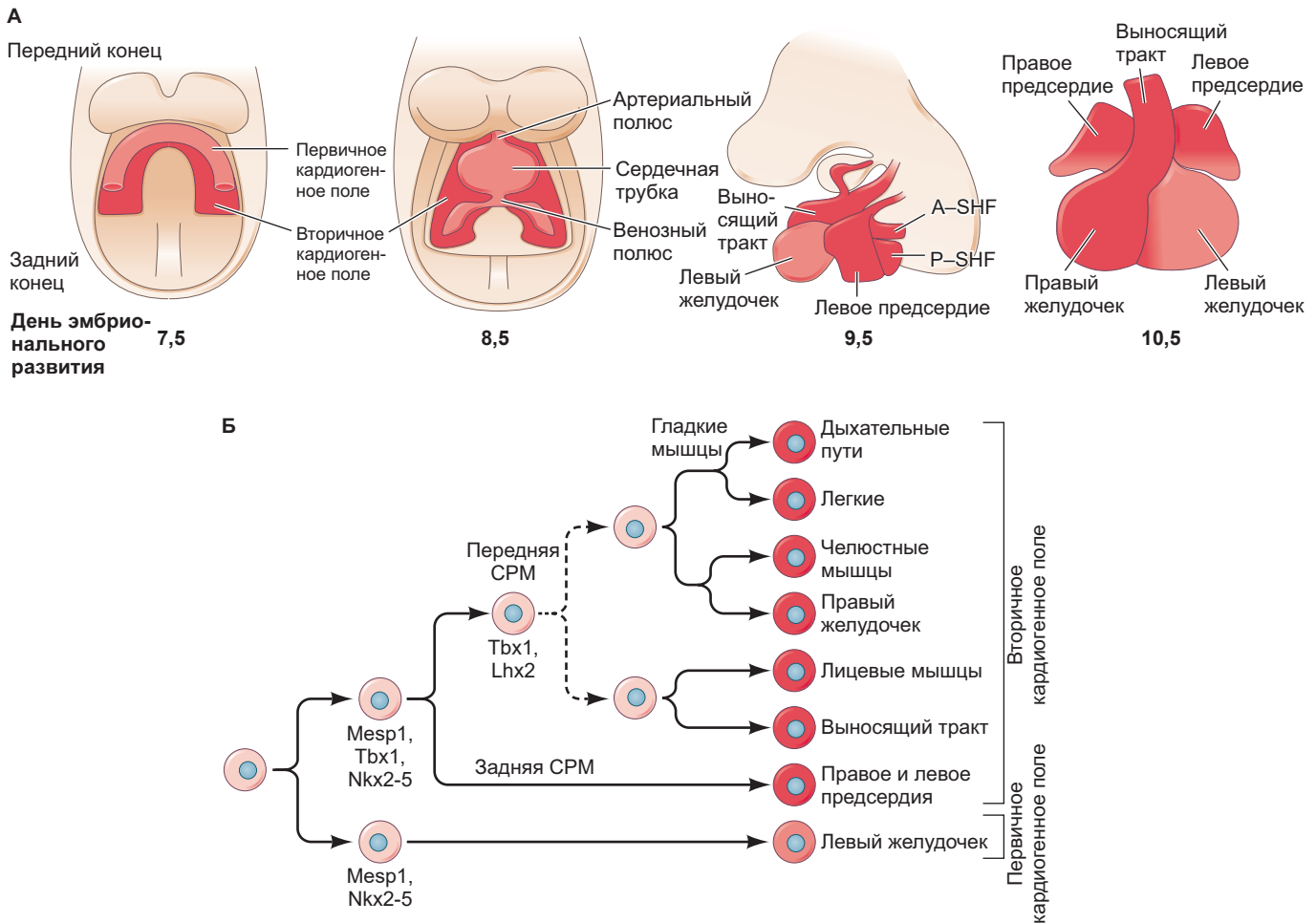


Рис. 18.13. Кардиогенные поля у мышиного зародыша. **А.** На 7,5-й день эмбрионального развития кардиогенная мезодерма обеих боковых сторон тела объединяется в сердечный серп, включающий и первичное и вторичное поле. Первичное кардиогенное поле преимущественно дает начало левому желудочку. К 10,5 дню вторичное поле вносит свой вклад в три другие камеры (правый желудочек и оба предсердия), а также в выносящий тракт, который изначально включает аорту и легочную артерию. Показаны переднее и заднее вторичные кардиогенные поля (A-SHF и P-SHF). **Б.** Предполагаемые отношения клеточных линий, показывающие взаимодействие первичного и вторичного кардиогенных полей при формировании сердца. Видно общее происхождение клеток сердца, легких и легочных кровеносных сосудов из вторичного кардиогенного поля. Пунктирная линия означает, что точных данных о разделении клеток-предшественников легких, их сосудов, лицевых мышц и сердца пока не получено. Некоторые из транскрипционных факторов, связанных с этими клетками кардиофарингеальной мезодермы (CPM), перечислены снизу. (Рис. А по данным: R. G. Kelly, 2012. *Curr Top Dev Biol* 100: 33–65; рис. Б по данным: R. Diogo et al., 2015. *Nature* 520: 466–473 и T. Peng et al., 2013. *Nature* 500: 589–592.)

в приносящий тракт сердца. Спереди вторичное кардиогенное поле у амниот образует правый желудочек (и часть единственного желудочка у рыб), а также выносящий тракт (артериальный конус и артериальный ствол), который является основой аорты и легочных артерий (de la Cruz et al., 1989; Kelly, 2012; Liu and Stainier, 2012). Только в процессе закручивания сердечной трубки в петлю предсердия оказываются спереди от желудочков, образуя взрослое четырехкамерное сердце.

Вторичное кардиогенное поле примечательно тем, что содержит не только клетки-предшественники сердца, но и клетки будущих мышц лица, мезенхимы легкого, легочной артерии и вены (Lescroart et al., 2010, 2015; Peng et al., 2013). Таким образом, клетки-предшественники сердца специальным образом координируют свое поведение с развитием лица и легких. Считается, что общий зачаток глоточной и сердечной мезодермы происходит из схожей группы клеток-предшественников, которые обнаружены у некоторых вторичноротых беспозвоночных, таких как оболочники (Diogo et al., 2015).

Кардиогенные поля¹ дают все клеточные элементы сердца — **кардиомиоциты** (формируют мышечные слои), **эндокард** (формирует внутренний слой), **эндокардиальные подушки** клапанов, **эпикард** (формирует коронарные кровеносные сосуды, питающие сердце) и **волокна Пуркинье**², которые координируют сердцебиение (Mikawa, 1999; van Wijk et al., 2009). Более того, похоже, что каждая клетка-предшественник способна стать любым из дифференцированных клеточных типов сердца. Дополнительные клетки поступают из сердечного отдела нервного гребня и помогают в построении выносящего тракта и перегородки, отделяющей аорту от легочного ствола (см. рис. 15.21; Porras and Brown, 2008).

Спецификация кардиогенной мезодермы

Спецификация клеток кардиогенной мезодермы происходит благодаря их взаимодействиям с глоточной энтодермой и хордой. Если эта передняя часть энтодермы удалена, сердце не формируется и задняя энтодерма не способна индуцировать образование сердечных клеток (Nascone and Mercola, 1995; Schultheiss et al., 1995). Лиганды BMP (особенно BMP2) из передней энтодермы способствуют развитию как сердца, так и крови. Энтодермальные BMP индуцируют также синтез Fgf8 в энтодерме непосредственно под кардиогенной мезодермой. Считается, что Fgf8 является критическим для экспрессии специфичных сердечных белков (Alsan and Schultheiss, 2002).

Существуют и ингибирующие сигналы, которые препятствуют формированию структур сердца там, где их не должно быть. Во-первых, хорда секретирует Noggin и Chordin, блокируя сигналы BMP в центре

зародыша, а специфичные Noggin-секретирующие клетки миотома предотвращают спецификацию сердечных клеток в сомитах. Во-вторых, белки Wnt из нервной трубки, особенно Wnt3a и Wnt8, ингибируют образование сердца, но способствуют образованию крови. Более того, передняя энтодерма продуцирует ингибиторы Wnt, которые препятствуют связыванию этих лигандов со своими рецепторами. Таким образом, клетки-предшественники сердца образуются там, где перекрываются области влияния BMP (из латеральной мезодермы и энтодермы) и антагонистов Wnt (из передней энтодермы) (рис. 18.14; Marvin et al., 2001; Schneider and Mercola, 2001; Tzahor and Lassar, 2001; Gerhart et al., 2011). BMP в отсутствие сигналов Wnt активируют *Nkx2-5* и *Mesp1* — два ключевых гена регуляторной сети спецификации сердечных клеток.

Миграция клеток-предшественников сердца

Поскольку презумптивные клетки сердца мигрируют вперед между эктодермой и энтодермой к средней линии зародыша, они остаются в тесном контакте с поверхностью энтодермы (Linask and Lash, 1986). У курицы направленность этой миграции, по-видимому, обеспечивает энтодерма передней кишки. Если энтодерму, подстилающую сердечную область, перевернуть относительно главной оси тела, то клетки кардиогенной мезодермы меняют направление своей миграции на противоположное. Считается, что ответственный за это движение компонент энтодермального происхождения представляет собой передне-задний градиент концентрации фибронектина. Только антитела против фибронектина, но не против других компонентов внеклеточного матрикса останавливают эту миграцию (Linask and Lash, 1988).

В данном движении участвуют два потока мигрирующих клеток-предшественников сердца, один на правой стороне зародыша, а другой — на левой. У каждой стороны тела есть собственные первичное и вторичное кардиогенные поля, и на каждой стороне начинается формироваться собственная сердечная трубка. У курицы левое и правое кардиогенные поля сближаются примерно к стадии семи пар сомитов, когда передняя кишка уже образована внутренней складкой спланхоплевры. Встречное движение соеди-

¹ Может существовать и третье кардиогенное поле, распространяющееся кзади (Bressan et al., 2013). У куриного зародыша третье поле включает клетки, которые дают миоциты-пейсмейкеры (водители ритма), стимулирующие периодические сокращения сердечной мышцы.

² Обратите внимание, что специализированные нервные волокна миокарда не то же самое, что *нейроны Пуркинье* в мозжечке, упомянутые в гл. 13. Оба термина названы в честь чешского анатома и гистолога XIX в. Яна Пуркинье.

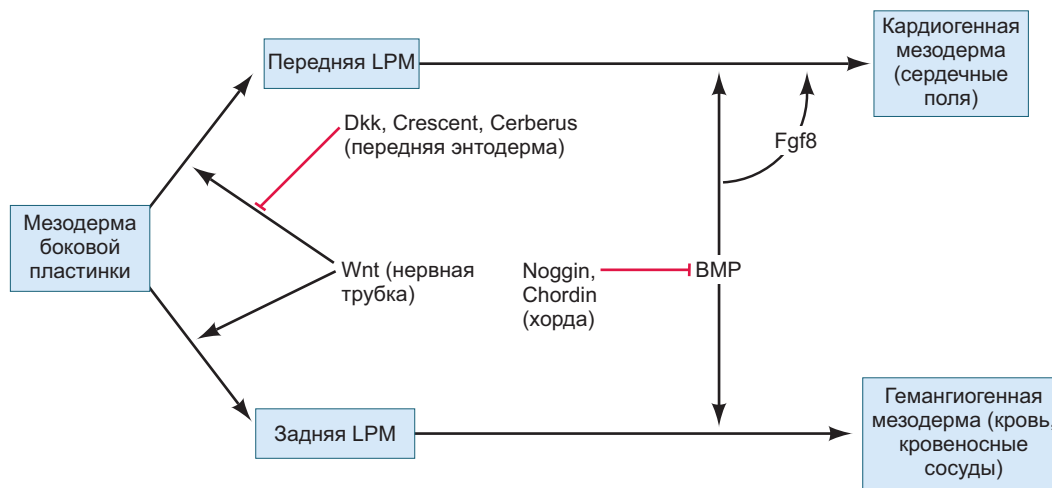


Рис. 18.14. Модель индуктивных взаимодействий с участием путей BMP и Wnt, задающих границы кардиогенной мезодермы. Сигналы Wnt от нервной трубки инструктируют мезодерму боковой пластинки (LPM) для дифференцировки в направлении клеток крови и кровеносных сосудов. В передней части тела ингибиторы Wnt (Dickkopf [Dkk], Crescent, Cerberus) из глоточной энтодермы препятствуют функционированию Wnt, позволяя более поздним сигналам (BMP, Fgf8) превращать мезодерму боковой пластинки в кардиогенную мезодерму. Сигналы BMP также важны для дифференциации гемангиогенной (дающей кровь и кровеносные сосуды) мезодермы. В центре зародыша сигналы Noggin и Chordin из хорды блокируют лиганды BMP. Таким образом, сердечные и кроветворные поля не образуются в центре тела

няет две сердечные трубки вместе (Varner and Taber, 2012). Непродолжительное время внутри общего вытянутого зачатка лежат две эндокардиальные трубки, но в итоге и они сливаются воедино. Билатеральное происхождение сердца можно продемонстрировать, предотвращая слияние мезодермы боковой пластинки хирургическим путем (Gräper, 1907; DeNaan, 1959). Эта манипуляция приводит к состоянию, называемому *cardia bifida*, при котором образуются два отдельных сердца, по одному на каждой стороне тела (**рис. 18.15**). Таким образом, энтодерма индуцирует предшественников сердца, задает направление их миграции и механически объединяет два потока кардиогенных клеток.

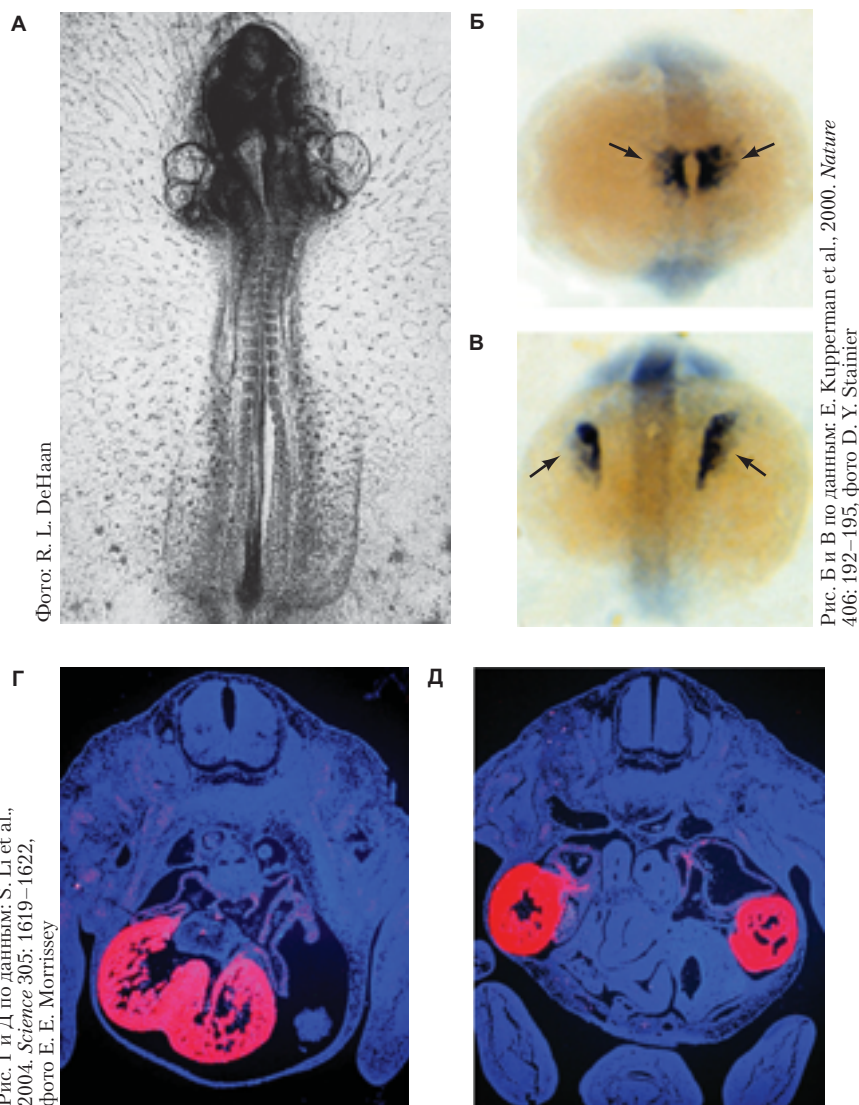
В то время как клетки первичного кардиогенного поля мигрируют вдоль энтодермы, образуя сердечную трубку, клетки вторичного поля остаются в контакте с глоточной энтодермой. Здесь происходит поддержание их пролиферации благодаря комбинации паракринных факторов (вероятно, таких как Sonic hedgehog, Fgf8 и Wnt; Chen et al., 2007; Lin et al., 2007). Клетки вторичного кардиогенного поля можно идентифицировать по экспрессии транскрипционного фактора Islet1. Эти клетки тоже начинают синтезировать и секретировать Fgf8, который действует аутокринно, стимулируя клетки к миграции и присоединению к переднему и заднему концам сердечной трубки, образованной клетками-предшественниками из первичного кардиогенного поля (Park et al., 2008). Передняя область вторичного кардиогенного поля вносит вклад в правый желудочек и выносящий тракт, а задняя область

формирует предсердия (Zaffran et al., 2004; Verzi et al., 2005; Galli et al., 2008).

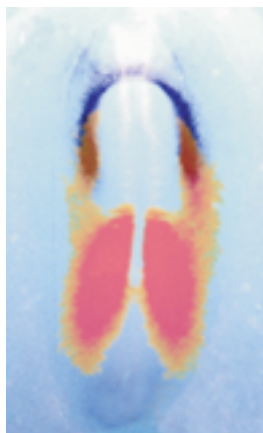
По мере того как клетки-предшественники мигрируют из вторичного кардиогенного поля, сзади они подвергаются воздействию увеличивающихся концентраций ретиноевой кислоты (RA), продуцируемой в задней мезодерме. RA имеет решающее значение в определении пути развития задних клеток-предшественников в направлении приносящих или «венозных» элементов сердца — венозных синусов и предсердий. Первоначально эти пути не предопределены, так как эксперименты по трансплантации или перевороту зачатков показывают, что клетки-предшественники способны к регуляции и дифференцировке в соответствии с новым окружением. Но как только сзади лежащие предшественники сердца входят в область активного синтеза RA, они активируют ген ретиноальдегиддегидрогеназы-2, что позволяет им производить собственную RA, и их дальнейшее развитие окончательно предрешиено (**рис. 18.16**; Simões-Costa et al., 2005).

Как и при развитии почек, ретиноевая кислота регулирует экспрессию Нох-генов (особенно *Нох1*, *Нохb1* и *Нохa3*), которые, по-видимому, способствуют появлению различных региональных идентичностей у предшественников из вторичного кардиогенного поля (Bertrand et al., 2011). У мышей область клеток будущего выносящего тракта, равно как и клетки сердечного нервного гребня, которые входят в эту область вторичного поля, демонстрируют дифференциальную экспрессию Нох-генов в зависимости от воздействия RA (Diman et al., 2011). Способность

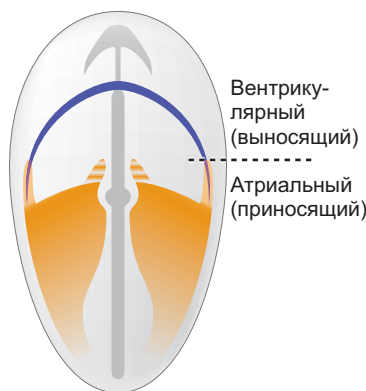
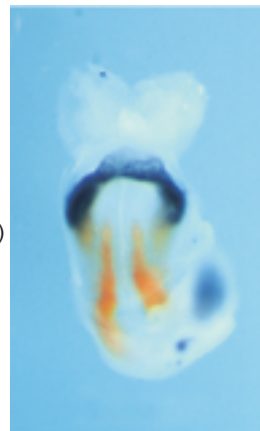
Рис. 18.15. Миграция сердечных зачатков. **А.** Состояние *cardia bifida* (два сердца) у куриного зародыша, вызванное хирургическим разрезом по вентральной средней линии, который помешал объединению двух зачатков сердца. Зародыш *Danio* дикого типа (**Б**) и мутант *miles apart* (**В**), окрашенные на мРНК легкой цепи сердечного миозина. У мутантов *miles apart* нарушена миграция клеток сердца. **Г.** Сердце мыши, окрашенное антисмысловым РНК-зондом к миозину желудочков, демонстрирует слияние зачатков сердца у 13,5-дневного зародыша дикого типа. **Д.** *Cardia bifida* у мышинового зародыша с подавленной экспрессией *Foxp4*. Примечательно, что каждое из этих сердец имеет и желудочки, и предсердия, петлеобразно скручено и образует все четыре камеры с нормальной лево-правой асимметрией



А Куриный зародыш, стадия 8



Б Мышиный зародыш, 8 дней



По данным: M. Simões-Costa et al., 2005. *Dev Biol* 277: 1–15, фото J. Xavier-Neto

Рис. 18.16. Двойная гибридизация *in situ* показывает экспрессию гена *Raldh2* (оранжевый), который кодирует фермент биосинтеза ретиноевой кислоты ретинальдегиддегидрогеназа-2, и гена *Tbx5* (темно-синий) — маркера ранних кардиогенных полей. На представленных стадиях развития клетки-предшественники сердца подвергаются воздействию постоянно увеличивающегося количества ретиноевой кислоты. **А.** Куриный зародыш, стадия 8 (26–29 ч инкубации). **Б.** Мышиный зародыш, 8-й день развития

РА специфицировать и детерминировать клетки-предшественники сердца в предсердие объясняет ее тератогенное влияние на развитие сердца. В случае воздействия RA на зародышей позвоночных она может вызвать экспансию тканей предсердия за счет тканей желудочков (Stainier and Fishman, 1992; Hochgreb et al., 2003).

Начало дифференцировки клеток сердца

Одним из наиболее важных открытий в развитии сердца была демонстрация того, что различные его клетки — миоциты желудочков и предсердий, гладких мышц кровеносных сосудов, эндотелиальной выстилки сердца и клапанов, а также эпикарда, образующего оболочку сердца, — происходят из одного и того же типа клеток-предшественников (Kattman et al., 2006; Moretti et al., 2006; Wu et al., 2006). И действительно, сегодня ученые полагают, что существует ранняя мультипотентная популяция клеток, которая несет ответственность за формирование всей системы кровообращения. Под влиянием определенного набора факторов их потомки становятся **гемангиобластами** — клетками-предшественниками кровеносных сосудов и форменных элементов крови; в условиях, наблюдаемых в кардиогенном поле, из него образуются **мультипотентные клетки-предшественники сердца** (рис. 18.17; Linask, 2003; Anton et al., 2007).

После активации в этих областях определенных пионерных факторов транскрипции (Nkx2-5, Mesp1, Gata4 и Tbx5) дифференцировка клеточных линий сердца идет благодаря самоподдерживающимся генным регуляторным сетям.

Образование петли сердечной трубки

У трехдневных куриных зародышей и четырехнедельных зародышей человека сердце представляет собой двухкамерную трубку, состоящую из предсердия (для приема крови) и желудочка (для откачки крови). (Даже невооруженным глазом у куриного зародыша можно увидеть замечательный цикл движения крови, поступающей в нижнюю камеру и выкачиваемой через аорту.) Закручивание сердца превращает исходную передне-заднюю полярность сердечной трубки в право-левую полярность, присущую взрослому организму. Когда образование петли завершается, материал будущих предсердий располагается спереди от той части сердечной трубки, которая станет желудочками (рис. 18.18).

Этот важнейший процесс начинается с того, что передняя часть сердца задает направление изгиба. Закручивание начинается сразу после возникновения ритмичных сокращений сердца и начала кровотока; завершить скручивание петли помогает именно давление перекачиваемой крови (Hove et al., 2003; Groenendijk et al., 2005). По мере увеличе-

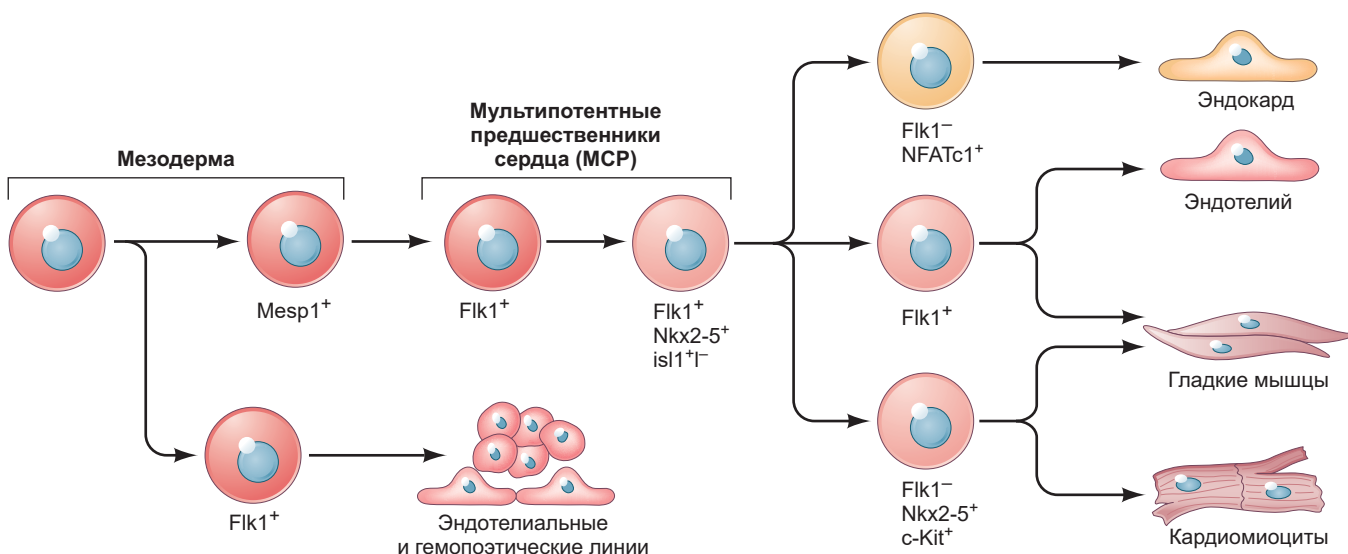


Рис. 18.17. Модель образования клеточных линий сердечно-сосудистой системы. Спланхническая мезодерма дает начало двум линиям, каждая из которых содержит на клеточных мембранах Flk1 (рецептор VEGF). Более ранняя популяция дает начало гемангиобластам (предшественникам клеток крови и кровеносных сосудов), а поздняя — сердечным клеткам-предшественникам. Последняя популяция, в свою очередь, формирует множество клеточных типов, чьи взаимоотношения все еще неясны, однако происхождение всех этих клеток может быть отслежено до кардиогенных клеток-предшественников. (По данным: R. Anton, 2007. *BioEssays* 29: 422–426 и D. M. DeLaughter et al., 2011. *Birth Defects Res A: Clin Mol Teratol* 91: 511–525.)

ния изгиба сердечной трубки в нее поступает все больший объем крови. Предполагается, что различия в объеме распознаются клетками через сигналы от внеклеточного матрикса и цитоскелета (Linask et al., 2005; Garita et al., 2011). Далее происходит точное выравнивание камер сердца относительно

друг друга, необходимое для корректной передачи сигналов. Сигналы обеспечивают формирование клапанов сердца, перегородок предсердий и желудочков, а также объединение сердца с сосудистой системой, которая развивалась в зародыше одновременно с сердцем.

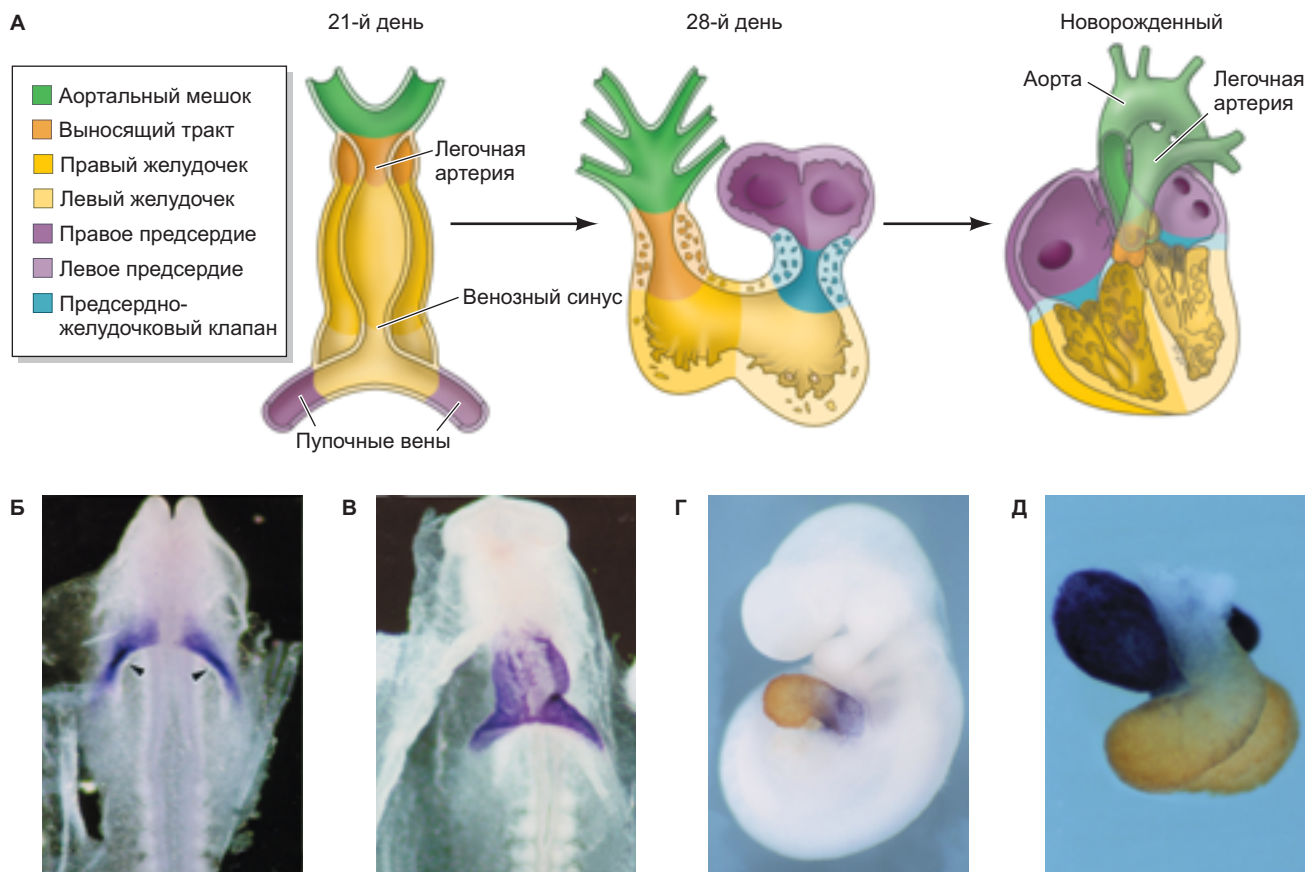


Рис. Б и В по данным: D.-Z. Wang et al., 1999. *Development* 126: 1281–1294, фото J. J.-C. Lin

Рис. Г и Д по данным: J. Xavier-Neto et al., 1999. *Development* 126: 2677–2687, фото N. Rosenthal

Рис. 18.18. Формирование петли сердца и камер. **А.** Схематичное изображение морфогенеза сердца у человека. На 21-й день развития сердце представляет собой однокамерную трубку. Ее региональная спецификация показана в цвете. К 28-му дню образуется петля, укладывающаяся презумптивные предсердия впереди презумптивных желудочков. У новорожденного клапаны и камеры сердца определяют пути циркуляции, так что левый желудочек перекачивает кровь в аорту, а правый желудочек — в легочную артерию. **Б, В.** Экспрессия *Xln* при слиянии правого и левого зачатков сердца у куриного зародыша. Клетки, предназначенные для формирования миокарда, экспрессируют мРНК *Xln*, белковый продукт которого необходим для образования петли сердечной трубки. **Б.** На стадии 9 у нейрулы куриного зародыша экспрессию *Xln* (фиолетовый) можно наблюдать в двух симметричных кардиогенных полях (стрелки). **В.** Перед формированием петли у куриного зародыша (на стадии 10) происходит слияние двух кардиогенных областей. **Г, Д.** Спецификация предсердий и желудочков осуществляется еще до образования петли. Предсердия и желудочки мышиноного зародыша синтезируют разные типы миозина (миозин предсердия окрашен голубым, миозин желудочка — оранжевым). **Г.** В трубкообразном сердце (до образования петли) оба миозина (и соответствующая им окраска) перекрываются в области предсердно-желудочкового канала, соединяющего будущие области сердца. **Д.** После образования петли темно-синее окрашивание видно в дефинитивном предсердии и приносящем тракте, в то время как желудочки отмечены оранжевой окраской. Неокрашенная область над желудочками — артериальный ствол. Он происходит преимущественно из нервного гребня и позднее подразделяется на аорту и легочные артерии. (Рис. А по данным: D. Srivastava and E. N. Olson, 2000. *Nature* 407: 221–226.)

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Формирование сердечных клапанов

По мере скручивания сердечной трубки изменения в эндокарде инициируют формирование клапанов. Сначала в канале между предсердием и желудочком, а также в выносящем тракте изогнутой сердечной трубки закладываются эндокардиальные подушки (Armstrong and Bischoff, 2004). Развитие подушки запускает сигнал от миокарда к эндокардиальным клеткам, активирующим экспрессию гена *Twist*. Транскрипционный фактор белок Twist инициирует эпителио-мезенхимный переход и миграцию клеток. Поэтому соответствующие эндокардиальные клетки покидают эндокард и мигрируют, образуя эндокардиальные подушки (Barnett and Desgrosellier, 2003; Shelton and Yutzey, 2008). Twist активирует также ген *Tbx20*, а совместно с *Tbx20* — белки, которые вызывают пролиферацию и обеспечивают жесткость клапанов.

Формирование кровеносных сосудов

Хотя сердце является первым функциональным органом тела, оно не начинает перекачивать кровь, пока сосудистая система зародыша не создаст свои первые петли. Вместо того чтобы вырастать из сердца, кровеносные сосуды формируются независимо, вскоре соединяясь с ним. Система кровообращения различается у всех индивидов, поскольку геном не может кодировать весь самый сложный набор связей между артериями и венами. На самом деле случайность играет ведущую роль в создании микроанатомии системы кровообращения. Однако у представителей одного вида она обладает большим сходством, потому что ее развитие жестко ограничено физиологическими, эволюционными и физическими параметрами.

Васкулогенез: начало формирования кровеносных сосудов

Кровеносные сосуды развиваются в ходе двух разделенных во времени процессов: **васкулогенеза** и **ангиогенеза** (рис. 18.19). В ходе васкулогенеза из мезодермы боковой пластинки образуется сеть кровеносных сосудов *de novo*. В период ангиогенеза первичная сеть перестраивается и прореживается, так что обособляются капиллярное русло, артерии и вены.

На первом этапе васкулогенеза комбинация сигналов BMP, Wnt и Notch активирует транскрипционный фактор Etv2. Клетки мезодермы боковой пластинки, выселяющиеся из первичной полоски в задней части зародыша, превращаются в гемангиобласты¹. Мечение

зародышей *Danio* флуоресцентными зондами для клеточного картирования зачатков подтвердило, что гемангиобласты являются общими предшественниками и гемопоэтических (дающих клетки крови), и эндотелиальных (дающих кровеносные сосуды) линий (Paik and Zon, 2010). Такая популяция бипотентных клеток-предшественников обнаружена только в вентральной части аорты — области, известной как источник двух обозначенных типов клеток. Путь дифференцировки клеток аорты в гемангиобласты, по-видимому, запускает ген *Cdx4*, тогда как детерминацию развития гемангиобласта в направлении предшественника клеток крови или предшественника кровеносного сосуда регулирует сигнальный путь Notch. Notch-сигналинг способствует превращению гемангиобластов в предшественники клеток крови, а снижение активности Notch приводит к эндотелиальной дифференцировке (Vogeli et al., 2006; Hart et al., 2007; Lee et al., 2009). Сигнал Notch активирует экспрессию транскрипционного фактора Runx1, который считают консервативным для позвоночных индуктором превращения эндотелиальных клеток в стволовые клетки крови (Burns et al., 2005, 2009).

МЕСТА ВАСКУЛОГЕНЕЗА

У амниот первичные сосудистые сети образуются в двух отдельных и независимых областях. Во-первых, **внезародышевый васкулогенез** происходит в **кровяных островках** желточного мешка. Кровяные островки образованы гемангиобластами. Они дают начало ранней сосудистой сети, а также популяции эритроцитов, которые функционируют в раннем зародыше и необходимы для его питания (рис. 18.20A). Исследования на мышах (Frame et al., 2016) позволили предположить, что дефинитивные (постнатальные) стволовые клетки крови тоже появляются из кровяных островков желточного мешка. Во-вторых, **васкулогенез внутри тела зародыша** формирует дорсальную аорту, так что исходящие из нее сосуды соединяются с капиллярными сетями, которые образуются из мезодермальных клеток в каждом органе. Первоначальный каркас дорсальной аорты происходит из клеток сомита, мигрирующих вентрально.

¹ Корень *гем-* (*гемат-*) обозначает кровь (например, в слове *гемоглобин*). Точно так же *ангио-* относится к кровеносным сосудам. Корень *-бласт* обозначает быстро делящуюся клетку (обычно стволовую). Корень *-поэз* означает происхождение или формирование (его можно найти и в слове *поэзия*). Таким образом, *гемопоэтические* (*гематопоеэтические*) стволовые клетки — это клетки, дающие разные типы кровяных клеток. Латинский корень *-genesis* (как в слове *ангиогенез*) соответствует греческому *-poiesis*. Названия гемопоэтических мутантов рыбок *Danio* могут быть очень поэтичными. Большинство из них названо в честь вин, а один из генов, дающих бескровный фенотип, назван *vlad tepes* в честь легендарного Влада Дракулы.

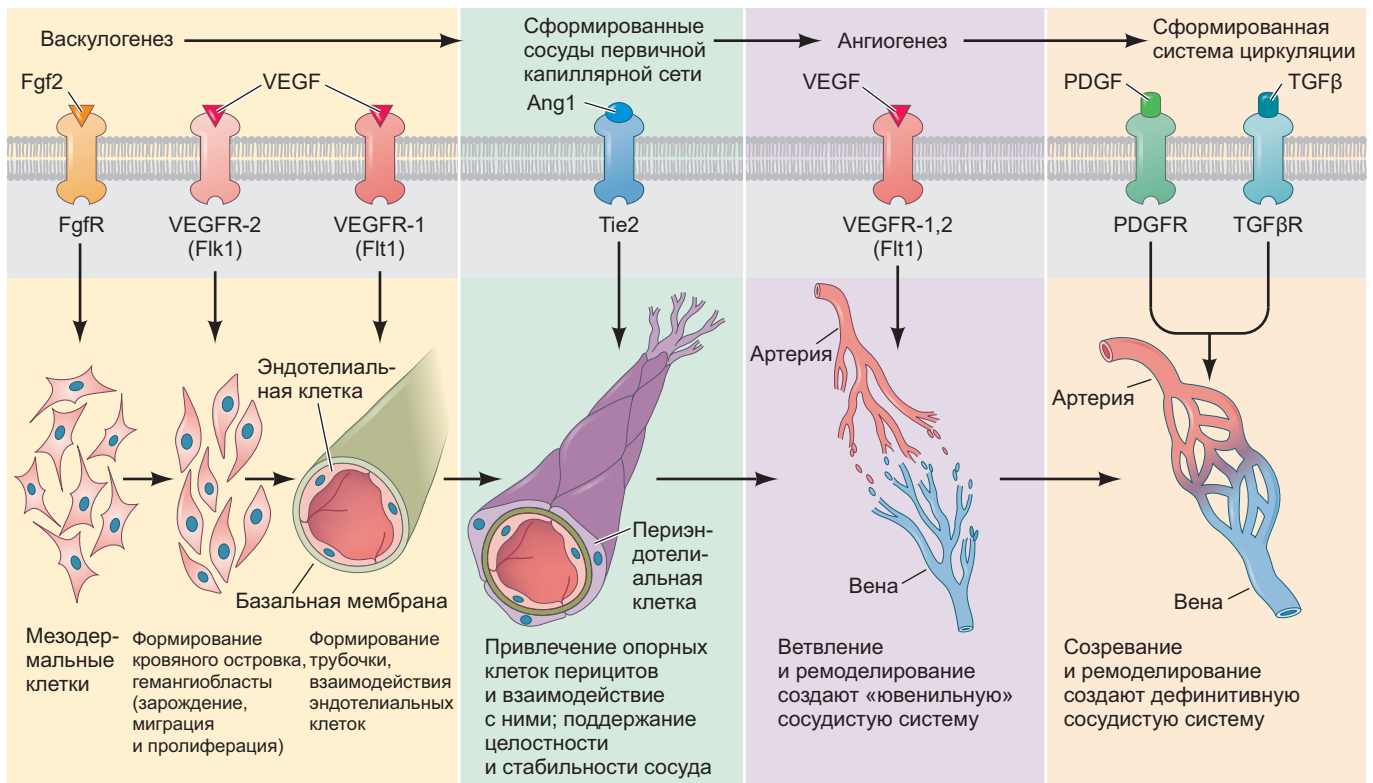
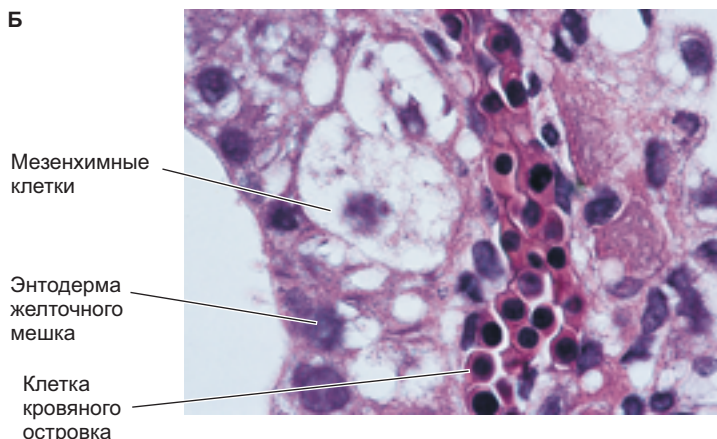


Рис. 18.19. Васкулогенез и ангиогенез. Васкулогенез включает в себя образование кровяных островков, содержащих гемангиобласты, и построение из них капиллярных сетей (левая часть рисунка), ангиогенез — ремоделирование старых кровеносных сосудов и построение на их основе новых сосудов. Ангиогенез завершает формирование замкнутого кровеносного русла, начатое васкулогенезом. Основные паракринные факторы, задействованные на каждом этапе, представлены в верхней части схемы, их рецепторы (на сосудобразующих клетках) указаны под ними. (По данным: D. Hanahan, 1997. *Science* 277: 48–50 и W. Risau, 1997. *Nature* 386: 671–674.)



По данным: I. Katayama and H. Kayano, 1999. *New Eng J Med* 340: 617, с разрешения

Рис. 18.20. Васкулогенез. **А.** Образование кровеносных сосудов впервые происходит в стенке желточного мешка, где скопления недифференцированных мезенхимных клеток формируют кровяные островки. В центре этих кластеров образуются клетки крови, а на периферии развиваются эндотелиальные клетки кровеносных сосудов. **Б.** Кровяной островок у человека в мезодерме, окружающей желточный мешок. (Микрофотография зародыша, полученного в результате трубной беременности, — зародыша, которого необходимо было удалить, так как он имплантировался в яйцевод, а не в матку.) (Рис. А по данным: J. Langman, 1981. *Medical Embryology*, 4th Ed. Williams & Wilkins: Baltimore.)

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

РАЗВИТИЕ КРОВЯНОГО ОСТРОВКА

Агрегация образующих эндотелий клеток в желточном мешке является критическим этапом развития амниот, поскольку кровяные островки в его стенке образуют вены, которые доставляют питательные вещества к зародышу и транспортируют газы к местам их обмена и обратно (рис. 18.20Б). У птиц эти сосуды называют **желточными венами**; у млекопитающих — **омфаломезентерическими** (пупочными) **венами**. У куриного зародыша кровяные островки впервые появляются на стадии максимальной длины первичной полосы в пределах *area opaca* (Pardanaud et al., 1987). Они образуют тяжи из гемангиобластов (вскоре формирующие полость), которые на периферии становятся плоскими эндотелиальными клетками, выстилающими сосуды, а клетки в центре дают начало клеткам крови. По мере роста кровяных островков они сливаются, образуя капиллярную сеть. Их содержимое стекает в две желточные вены, которые доставляют питание и клетки крови к новообразованному сердцу.

ФАКТОРЫ РОСТА И ВАСКУЛОГЕНЕЗ

За начало васкулогенеза ответственны три фактора роста (рис. 18.19). Один из них, **основной фактор роста фибробластов** (Fgf2), необходим для появления гемангиобластов из спланхической мезодермы. Если клетки бластодисков перепела диссоциировать в культуре, они не формируют ни кровяных островков, ни эндотелиальных клеток. Однако те же клетки, культивированные в присутствии белка Fgf2, дают кровяные островки и формируют клетки эндотелия (Flamme and Risau, 1992). У куриного зародыша Fgf2 синтезируется в хориоаллантоисной мембране и отвечает за ее васкуляризацию (Ribatti et al., 1995).

Второе семейство белков, вовлеченных в васкулогенез, — **факторы роста эндотелия сосудов** (VEGF). Это семейство включает в себя несколько VEGF, а также фактор роста плаценты (PlGF), который направляет масштабный рост кровеносных сосудов в плаценте. Считается, что каждый VEGF способен запустить дифференцировку ангиобластов (клеток-предшественников кровеносных сосудов) и их мультипликацию с образованием эндотелиальных трубок. Наиболее важный для нормального развития VEGF-A секретируют мезенхимные клетки вблизи кровяных островков, а соответствующие рецепторы присутствуют на гемангиобластах и ангиобластах (Millauer et al., 1993). В отсутствие гена, кодирующего VEGF-A, либо его основного рецептора (тирозинкиназного рецептора Flk1) у мышиных зародышей

не развиваются кровяные островки желточного мешка и полностью подавлен васкулогенез (рис. 18.21А; Ferrara et al., 1996). У мышей с мутацией по другому рецептору VEGF (Flt1) кровяные островки и дифференцированные эндотелиальные клетки появляются, но не формируют кровеносных сосудов (Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995). VEGF-A играет также важную роль при формировании кровеносных сосудов в развивающихся костях и почках.

Третий набор белков, **ангиопоэтины**, обеспечивают взаимодействие между эндотелиальными клетками и **перипитами** — клетками, подобными

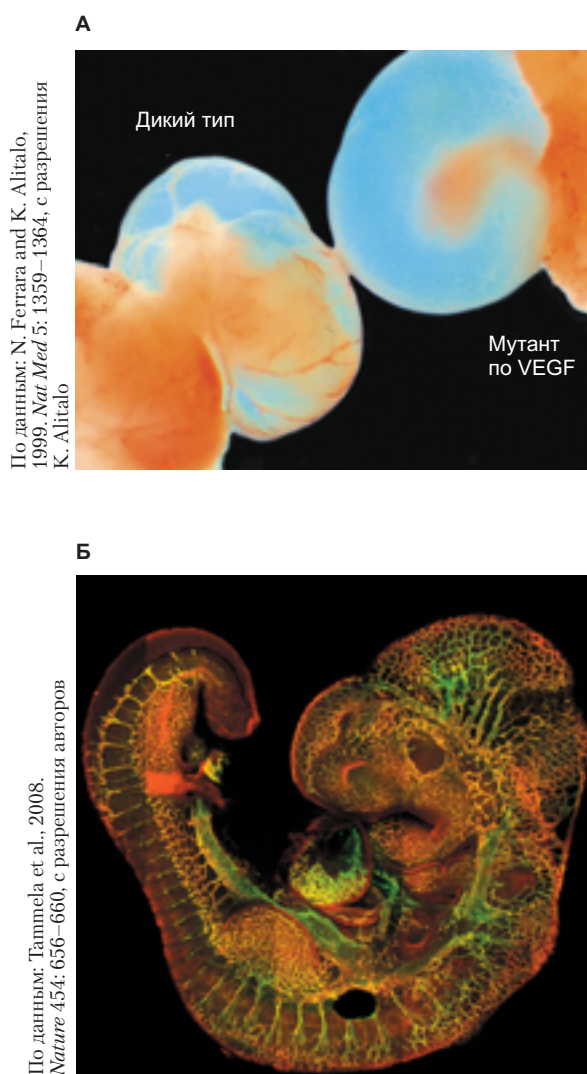


Рис. 18.21. VEGF и его рецепторы у мышиных зародышей. **А.** Желточный мешок мыши дикого типа и гетерозиготного мутанта с утраченным VEGF-A. У мутантного зародыша в желточном мешке не развиваются кровеносные сосуды, что ведет к летальному исходу. **Б.** У 9,5-дневного мышиного зародыша рецептор VEGFR-3 (красный), специфичный для апикальных эндотелиальных клеток, обнаружен на ангиогенном фронте капилляров (окрашен в зеленый)

гладкомышечным клеткам, которые привлекаются эндотелиоцитами и покрывают их. Мутации ангиопоэтинов либо их рецептора Tie2 ведут к формированию аномальных кровеносных сосудов, лишенных гладкой мускулатуры, которая обычно их окружает (Davis et al., 1996; Suri et al., 1996; Vikkula et al., 1996; Moyon et al., 2001).

Ангиогенез: ветвление кровеносных сосудов и перестройка сосудистого русла

За начальной фазой васкулогенеза следует ангиогенез: перестройка первичных капиллярных сетей и формирование вен и артерий (см. рис. 18.19). Критическим фактором ангиогенеза является VEGF-A (Adams and Alitalo, 2007). Во многих случаях секреция фактора VEGF-A каким-либо органом индуцирует миграцию эндотелиальных клеток из существующих кровеносных сосудов в этот орган, что ведет к образованию там капиллярных сетей. Другие факторы, в том числе гипоксия (низкий уровень кислорода), тоже могут индуцировать секрецию VEGF-A, вызывающего рост кровеносных сосудов.

В ходе ангиогенеза часть эндотелиальных клеток существующих сосудов отвечает на сигнал VEGF и начинает «выпячиваться», чтобы сформировать новый сосуд. Они известны как **апикальные** (концевые) **клетки** и обладают рядом отличий от других клеток сосуда. (Если бы все эндотелиальные клетки отвечали одинаково, произошла бы дезинтеграция исходного кровеносного сосуда.) Апикальные клетки несут на своей поверхности лиганд Delta-like-4 (Dll4), который активирует Notch-сигналинг в соседних клетках, предотвращая их реакцию на VEGF-A (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006; Hellström et al., 2007). При экспериментальном подавлении экспрессии Dll4 апикальные клетки образуются в ответ на VEGF-A на большом участке кровеносного сосуда.

Апикальные клетки имеют филоподии, несущие на своей поверхности большое число рецепторных молекул VEGFR-2. Кроме того, они экспрессируют другой рецептор VEGFR-3, ингибирование которого значительно подавляет рост сосудов (рис. 18.21Б; Tammela et al., 2008). Эти рецепторы обеспечивают **вытягивание** апикальной клетки к источнику VEGF, так что ее деление происходит вдоль градиента VEGF. На самом деле, филоподии апикальных клеток реагируют на схожие сигналы и функционируют так же, как филоподии клеток нервного гребня и конусы роста нервов (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005; Eichmann et al., 2005). Для ориентации апикальных клеток по направлению к источнику VEGF важны семафорины, нетрины, нейропилины и белки split.

Кроветворение: стволовые клетки и долгоживущие клетки-предшественники

Каждый день мы теряем и восстанавливаем около 300 млрд клеток крови. Клетки крови разрушаются в селезенке, а их возобновление происходит из популяций стволовых клеток. Стволовая клетка способна к активной пролиферации, увеличивая количество себе подобных стволовых элементов (самообновление), а также дифференцированных клеток (см. гл. 5; рис. 5.1 и 5.3). В частности, при образовании клеток крови, или **гемопоэзе**, стволовые клетки делятся с образованием, во-первых, большего числа стволовых клеток и, во-вторых, клеток-предшественников, способных реагировать на окружающие условия дифференцировкой более чем в десяток типов зрелых клеток крови (Notta et al., 2016). Важнейшая стволовая клетка кроветворения — это **плюрипотентная гемопоэтическая стволовая клетка**, или просто **гемопоэтическая стволовая клетка** (ГСК), которая может давать все клетки крови и лимфоциты организма. ГСК достигает этого путем генерации ряда промежуточных клеток-предшественников, потенциал которых ограничен определенными клеточными линиями.

Места кроветворения

В начале 1900-х гг. многие исследователи (изучавшие множество видов позвоночных, включая мангустов, летучих мышей и человека) наблюдали появление клеток крови из вентрального эндотелия аорты (Adamo and Garcia-Cardeña, 2012). Однако в 1960-х гг. эксперименты на мышах привели к выводу, что все ГСК формируются из клеток внезародышевых кровяных островков, окружающих желточный мешок. Аортальный гемопоэз признали промежуточным звеном, своего рода остановкой, которую делали стволовые клетки на пути к селезенке и костному мозгу (места гемопоэза у взрослых мышей).

Однако в 1975 г. Франсуаза Дитерлен-Ливр пересадила ранний желточный мешок курицы на двухдневный (т. е. до начала кровообращения) зародыш перепела. В этом опыте химера была жизнеспособной, а клетки курицы и перепела легко различимы под микроскопом. Анализ показал, что все клетки крови позднего перепелиного зародыша происходят от хозяина (перепела), а не из трансплантированного куриного желточного мешка. Более того, активность кроветворения внутри зародыша ограничена одним основным участком: вентральной частью аорты (Dieterlen-Lièvre and Martin, 1981). Пересадка спланхноплевры из **области АГМ** (аорты-гонады-мезонефроса) мышинным зародышам из разных генетических линий тоже подтвердила, что именно зародышевые

ткани служат источником клеток дефинитивного гемопоэза у млекопитающих (Godin et al., 1993; Medvinsky et al., 1993). Вскоре после этого ГСК были идентифицированы в скоплениях клеток в вентральной области аорты мышиноного зародыша в возрасте 10,5 дней (Cumano et al., 1996; Medvinsky and Dziermak, 1996). Хотя, по современным данным, некоторые ГСК желточного мешка сохраняются у взрослой мыши (Samokhvalov et al., 2007; Frame et al., 2016), общепризнано, что этот сайт кроветворения производит клетки—переносчики кислорода только у ранних зародышей. Однако почти все стволовые клетки крови взрослого организма мигрируют в костный мозг из области АГМ (Jaffredo et al., 2010).

В 2009 г. несколько лабораторий предложили новый механизм образования клеток крови. Их гипотеза была основана на открытии нового типа клеток в области АГМ — клеток **гемогенного эндотелия**¹. Склеротом формирует гемангиобласты, которые мигрируют в дорсальную аорту и замещают большинство ее первичных клеток. Перед их замещением оставшиеся первичные (происходящие из мезодермы боковой пластинки) эндотелиальные клетки дорсальной аорты (лежащие к этому моменту в вентральной области) дают кроветворные стволовые клетки. Эти ГСК из кровеносных сосудов служат ключевым источником стволовых клеток крови взрослой особи (см. гл. 5). Анализ клеточных типов эндотелиального происхождения позволил выделить гемогенные эндотелиальные клетки. Именно от этой популяции происходят ГСК, мигрирующие в печень и костный мозг (Eilken et al., 2009; Lancrin et al., 2009). Было также установлено, что переход от эндотелиальных клеток к гемопоэтическим стволовым основан на активации фактора транскрипции *Runx1* (рис. 18.22). У мышей с удаленным геном *Runx1* стволовые клетки крови не формировались ни в желточном мешке, ни в пупочных артериях, ни в дорсальной аорте, ни в плацентарных сосудах (Chen et al., 2009; Tober et al., 2016).

По-видимому, регуляция гена *Runx1* имеет сложный и динамичный характер. Более того, синтез белка *Runx1* запускается только после начала сердцебиения. Если мутации, затрагивающие сердце, препятствуют току крови через аорту, *Runx1* не экспрессируется. Скорее всего, для активации гена *Runx1* в вентральном эндотелии дорсальной аорты требуются поперечные силы трения, создаваемые потоком жидкости (Adamo et al., 2009; North et al., 2009)². По-видимому, трение приводит к росту уровня оксида азота (NO) в эндотелии. NO, в свою очередь, активирует (возможно, через цГМФ) *Runx1* и другие гены кроветворения. Переход от гемогенных эндотелиальных клеток к ГСК, по-видимому, не связан с асимметричным митозом. Скорее имеет место перестройка цитоскелета и плотных контактов, напоминающая эпителио-мезенхимный переход, как в склеротоме или дермомиотоме (Yue et al., 2012).

У позвоночных неамниот источником ГСК служит спланхноплевра. В индукции кроветворных клеток у всех исследованных позвоночных решающую роль играют лиганды BMP. У лягушки *Xenopus* вентральная мезодерма образует большой кровяной островок, который является первым местом кроветворения. Эктопические BMP2 и BMP4 могут вызывать у *Xenopus* образование клеток крови и кровеносных сосудов, а подавление BMP предотвращает образование крови (Maéno et al., 1994; Hemmati-Brivanlou and Thomsen, 1995). У *Danio* гемопоэз обнаружен как в желточном мешке, так и в аорте. Как и у млекопитающих, вторая волна кроветворения происходит в аорте. ГСК возникают из вентрального эндотелия аорты (Bertrand et al., 2010; Kissa and Herbolme, 2010). Второй (дефинитивный) этап гемопоэза регулируют все те же генетические пути (включая BMP-сигналинг), ведущие к экспрессии *Runx1* (Mullins et al., 1996; Paik and Zon, 2010).

Ниша ГСК в костном мозге

Гемопоэтические стволовые клетки аорты создают пул, заселяющий печень, а затем и костный мозг (Coskun and Hirschi 2010). У человека аорта производит клетки крови примерно с 27-го по 40-й день развития (Tavian and Réault, 2005). ГСК костного мозга примечательны своей способностью дифференцироваться в красные кровяные тельца (эритроциты), белые кровяные клетки (гранулоциты, нейтрофилы и тромбоциты), моноциты (макрофаги и остеокласты) и лимфоциты. При трансплантации ГСК инбредным облученным мышам (генетически идентичным донорским клеткам и чьи собственные стволовые клетки были уничтожены радиацией) стволовые элементы могут заместить все типы клеток крови и лимфоидных клеток. По оценкам, приблизительно только одна из каждых 10 000 кле-

¹ Связь между гемогенной эндотелиальной клеткой и гемангиобластом противоречива. В целом считается, что гемангиобласты генерируют гемогенные эндотелиальные клетки (Ueno and Weissman, 2010) и что гемангиобласт является предшественником гемогенного эндотелия.

² Механическая передача биофизических сил, таких как напряжение от трения при движении крови, является основным фактором в развитии сердечно-сосудистой системы (Linask and Watanabe 2015). Напомним, что эти силы необходимы и для нормального развития сердца (Mironov et al., 2005), и для правильного паттернирования кровеносных сосудов (Lucitti et al., 2007; Yashiro et al., 2007). Они нужны также для фрагментации мегакариоцита (клетки-предшественника) в тромбоциты. Мегакариоциты в костном мозге вырастают своими небольшими отростками в кровеносные сосуды, окружающие нишу стволовых клеток, а сила потока крови отрывает эти отростки, и они становятся тромбоцитами (Junt et al., 2007).

ток крови является плюрипотентной ГСК (Berardi et al., 1995). В медицинской практике трансплантат костного мозга используют для передачи здоровых ГСК человеку, чьи лимфоциты, эритроциты или лейкоциты были уничтожены болезнями, приемом наркотиков или радиацией. В последние годы проводят более 50 000 таких трансплантаций ежегодно (Gratwohl et al., 2010).

Поддержание ГСК зависит от ниши, создаваемой паракринным фактором стволовых клеток **SCF** (от англ. stem cell factor). SCF связывается со своим рецептором — трансмембранным белком Kit. (Это связывание критично не только для ГСК, но и для

сперматогенных и пигментных стволовых клеток.) Для определения источника SCF в нише стволовых клеток созданы генетически рекомбинированные (трансгенные) мыши, у которых ген SCF заменили геном зеленого флуоресцентного белка во всех или в отдельных типах клеток (Ding et al., 2012). Если все клетки ниши экспрессировали GFP вместо SCF, то ГСК погибали. При удалении SCF лишь в определенных клеточных типах было обнаружено, что замена SCF на GFP в клетках крови, кости или мезенхимных клетках костного мозга не нарушает самоподдержание ГСК. Однако, если избавиться от экспрессии SCF отдельно в эндотелиальных

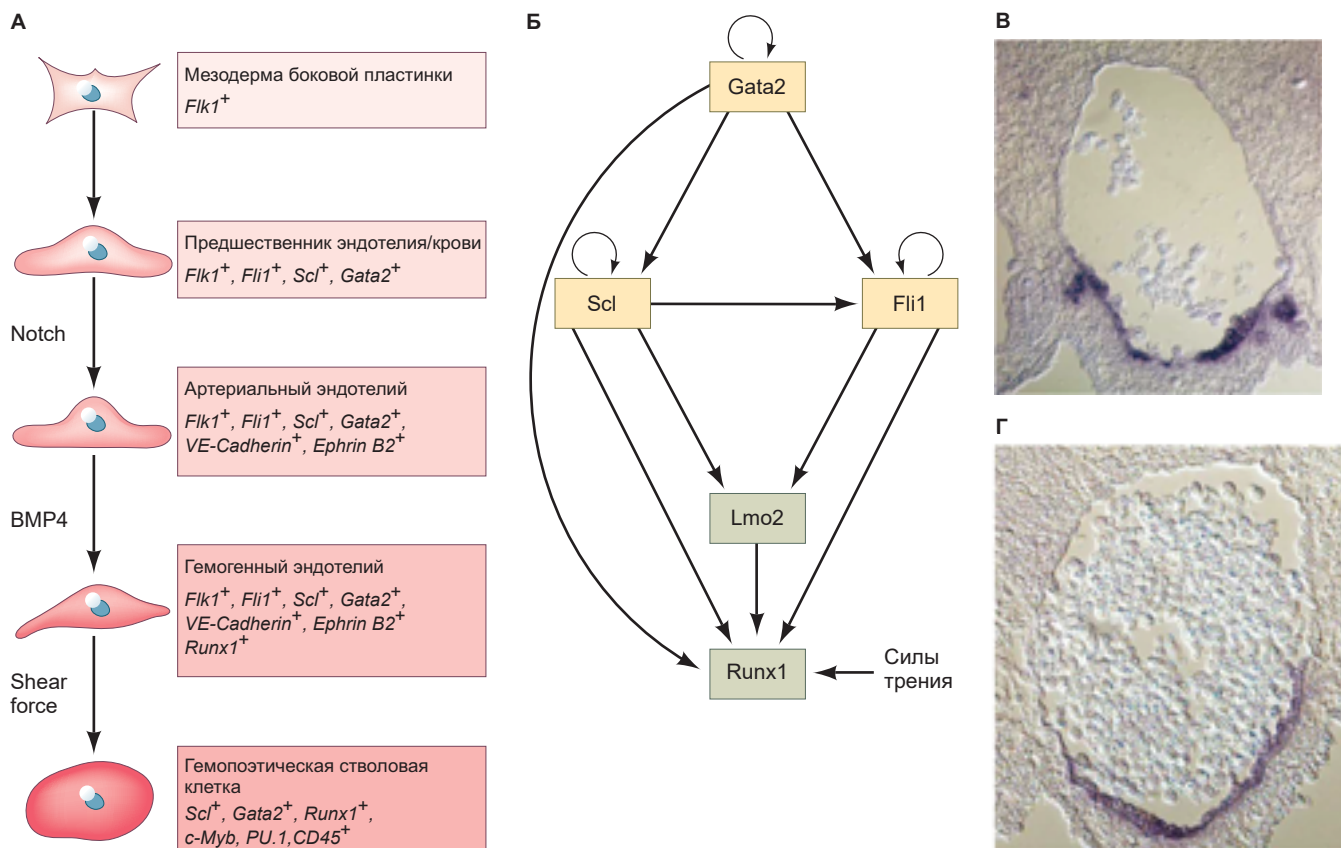


Рис. В и Г по данным: T. Jafredo et al., 2005. *Exp Hematol* 33: 1029–1040

Рис. 18.22. Путь формирования ГСК. **А.** У мышиного зародыша ГСК возникают из гемогенного эндотелия аорты. *Runx1* имеет решающее значение при превращении эндотелиальных клеток в стволовые клетки крови. Показано происхождение гемогенного эндотелия из мезодермы боковой пластинки, а также юстакринные и паракринные факторы, ответственные за различные этапы коммитирования. Справа перечислены гены-маркеры, связанные с каждой стадией. **Б.** Упрощенная схема активации *Runx1* в генной регуляторной сети развития ГСК у мыши. Факторы транскрипции *Gata2*, *Fli1* и *Scl* связываются с соседними сайтами на одном энхансере, расположенном на расстоянии в 23 п. о. от сайта инициации транскрипции *Runx1*. *Scl* имеет решающее значение, для того чтобы клетки крови и сосудов не превратились в сердечную мускулатуру. Путь механотрансдукции, которым силы трения помогают активировать *Runx1*, остается неизвестным. **В.** Экспрессия *Runx1* (фиолетовый цвет) в клетках стенки сосуда у куриного зародыша на стадии 19. **Г.** Кроветворные колонии, экспрессирующие *Runx1* у куриного зародыша на стадии 21. (Рис. А по данным: G. M. Swiers et al., 2010. *Int J Dev Biol* 54: 1151–1163; рис. Б по данным: J. E. Pimanda and B. Göttgens, 2010. *Int J Dev Biol* 54: 1201–1211.)

или периваскулярных (окружающих эндотелий) клетках, выживает намного меньше ГСК. А когда синтез SCF подавляли в обоих этих (но не в других) клеточных типах, погибали все ГСК. Таким образом, преимущественно периваскулярные клетки (и в некоторой степени эндотелиальные клетки) синтезируют SCF, необходимый для выживания ГСК (рис. 18.23).

SCF не единственный критически важный для ГСК паракринный фактор; существует множество других молекул, которые, по всей видимости, делают ГСК компетентными реагировать на паракринные и юстакринные факторы, управляющие дифференцировкой (Morrison and Scadden, 2014). В нишах стволовых клеток обычно содержатся долгоживущие покоящиеся ГСК, которые используются для создания клеток-предшественников на постоянной основе, а также короткоживущие ГСК, способные реагировать на неотложные физиологические потребности (рис. 18.24). Лиганды неканонического Wnt-пути секретируются остеобластами ниши для поддержания покоящихся ГСК, тогда как канонический Wnt-сигналинг может отвечать за их превращения в быстро пролиферирующие ГСК (Reya et al., 2003; Sugimura et al., 2012). Вполне вероятно, что у взрослых млекопитающих обновление миллиардов клеток крови зависит не от небольшого числа гемопоэтических стволовых клеток, а от устойчивого производства многочисленных долгоживущих клеток-предшественников, специфицированных в одном или нескольких направлениях клеточной дифференцировки (Sun et al., 2014).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Микроокружение, индуцирующее гемопоэз

Основные модели производства клеток крови представляют их дифференцировку в виде серии клеток-предшественников с прогрессивно уменьшающимися потенциями. В начале этого ряда стоят мультипотентные гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), от которых происходят более ограниченные мультипотентные стволовые клетки (такие как общие миелоидные клетки-предшественники, СМР), и, наконец, комитированные предшественники определенных клеточных линий. Считается, что дифференцировке клеток крови в ту или иную сторону способствуют эндокринные, паракринные и юстакринные факторы (рис. 18.24).

Один из основных эндокринных факторов (т. е. гормонов) — **эритропоэтин** — по-видимому, заставляет СМР давать больше клеток-предшественников мегакариоцитов/эритроцитов (МЕР) и побуждает МЕР к образованию большого количества эритроцитов (Lu et al., 2008; Klimchenko et al., 2009). Паракринными факторами, участвующими в развитии клеток крови и лимфоцитов, являются **цитокины**. Их могут продуцировать несколько типов клеток, но собираются и концентрируются эти молекулы на внеклеточном матриксе стромальных (мезенхимных) клеток в местах кроветворения (Hunt et al., 1987; Whitlock et al., 1987). Например,

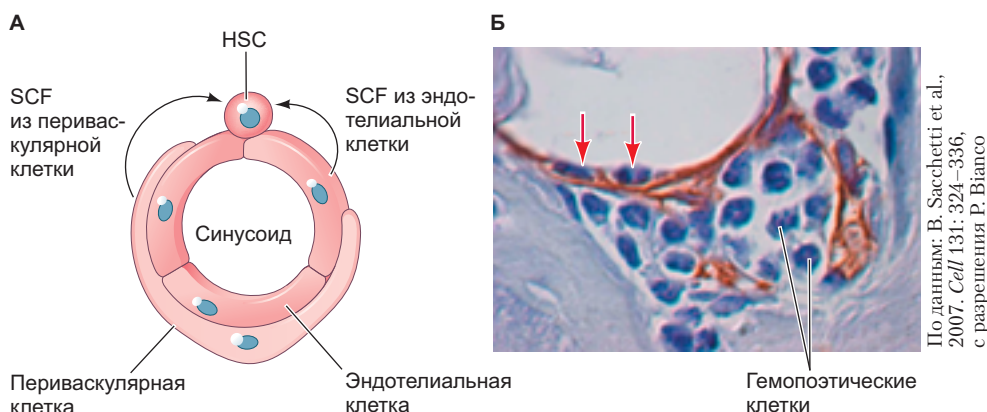


Рис. 18.23. Домом для HSC является ниша, в которой фактор стволовых клеток (SCF) производят периваскулярные (субэндотелиальные) клетки, а также эндотелиальные клетки синусоидов костного мозга. **А.** Упрощенная схема поперечного среза синусоида, на которой показана эндотелиальная выстилка и окружающая ее периваскулярная клетка. **Б.** Развитие ниши стволовых клеток при пересадке периваскулярных клеток человека (окрашены в коричневый цвет антителами к маркеру субэндотелиальных клеток CD146) в мышь. Через 8 недель после трансплантации отростки периваскулярных клеток устанавливают контакты с ГСК (как в костном мозге человека). Красными стрелками показаны гемопоэтические клетки между эндотелиальными и периваскулярными клетками. (Рис. А по данным: I. A. Shestopalov and L. I. Zon, 2012. *Nature* 481: 453–455.)

По данным: B. Sacchetti et al., 2007. *Cell* 131: 324–336, с разрешения P. Bianco

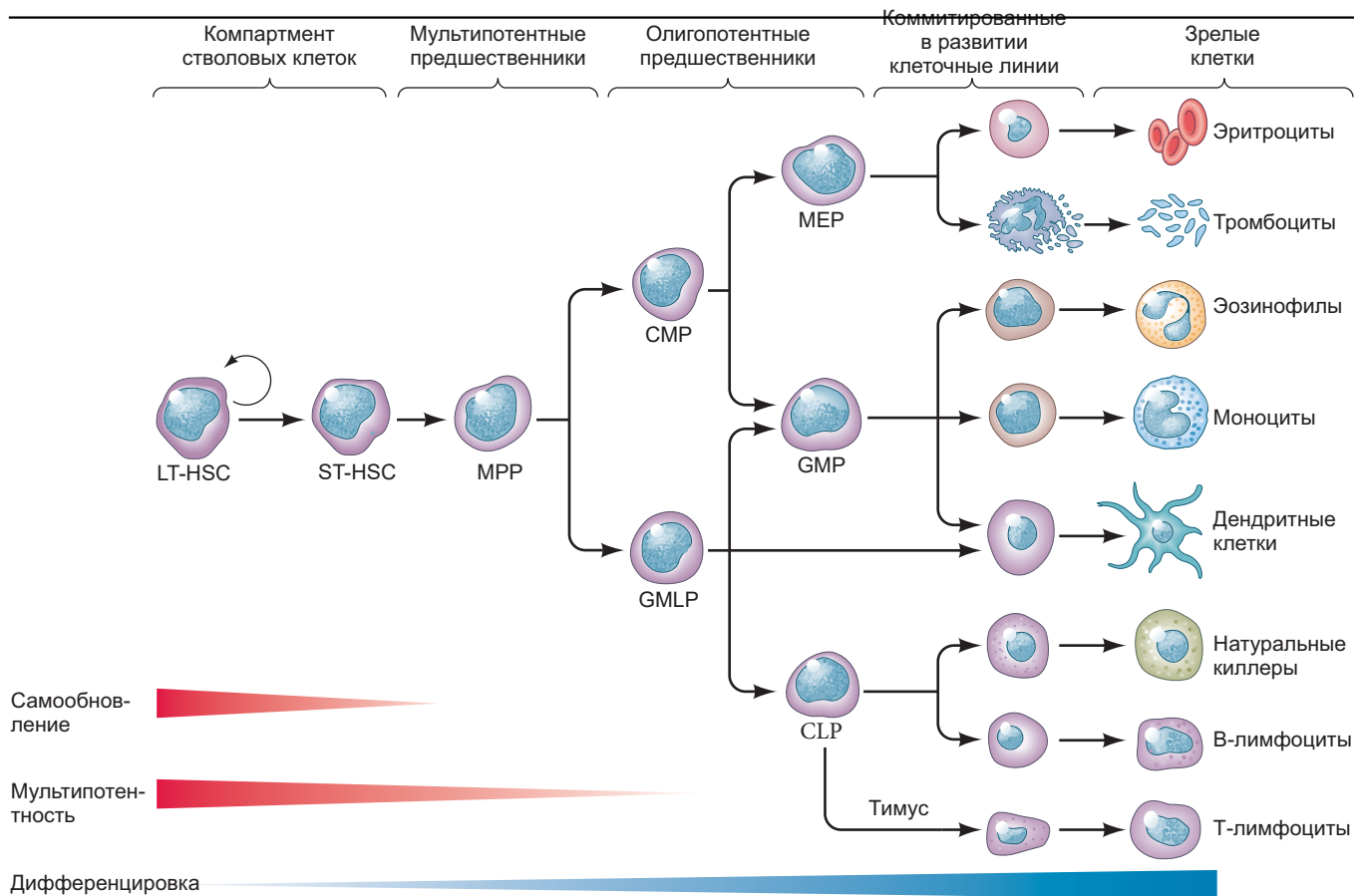


Рис. 18.24. Иерархия гемопоэтических линий. На вершине иерархии находятся долгоживущие ГСК (LT-HSC), которые дают начало короткоживущим ГСК (ST-HSC) с ограниченным потенциалом самообновления (см. гл. 5). Быстро делящиеся мультипотентные предшественники (MPP) все еще способны давать миелоидные (разновидности красных кровяных клеток) либо лимфоидные линии (различные белые кровяные клетки). На последующих этапах проспективные потенциалы клеток становятся все более ограниченными. Потомство MPP включает в себя общие миелоидные предшественники (CMP) и предшественники гранулоцитов/макрофагов/лимфоцитов (GMLP). В ходе дальнейшей дифференцировки образуются общие лимфоидные предшественники (CLP), предшественники гранулоцитов/макрофагов (GMP) и предшественники мегакариоцитов/эритроцитов (MEP). Эти предшественники и дадут отдельные типы красных и белых кровяных клеток. (По данным: S. M. Cullen et al., 2014. *Curr Top Dev Biol* 107: 39–75.)

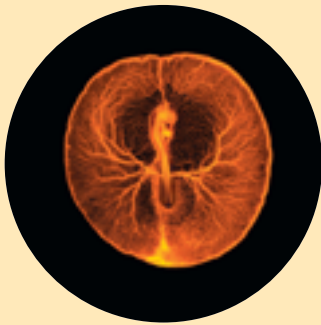
два белка — фактор роста гранулоцитарно-макрофагальных колоний (GM-CSF) и ростовой фактор интерлейкин 3 (IL3), стимулирующий многие клеточные линии, связываются с гепарансульфатным гликозаминогликаном стромы костного мозга (Gordon et al., 1987; Roberts et al., 1998). Внеклеточный матрикс затем способен представлять паракринные факторы стволовым клеткам в высоких концентрациях, достаточных для того, чтобы они связались с соответствующими клеточными рецепторами. На разных этапах своего развития стволовые клетки приобретают способность реагировать на различные факторы. Конкретный путь дифференцировки, выбранный потомком плюрипотентной ГСК, зависит от встреченных ростовых факторов и, следовательно, определяется стромальными клетками. Продemonстрировано, что взаимодействия

на коротких расстояниях между стромальными и стволовыми клетками определяют путь развития потомков ГСК (Wolf and Trentin, 1968). Исследователи помещали кусочки костного мозга в селезенку, а затем вводили туда еще и стволовые клетки. Оказавшиеся в селезенке CMP образовали преимущественно эритроидные колонии, тогда как клетки, заселившие костный мозг, образовали преимущественно гранулоцитарные колонии. Колонии, которые пересекали границы двух типов тканей, были преимущественно эритроидными в селезенке и гранулоцитарными в костном мозге. Такие области детерминации принято называть **микроокружением, индуцирующим гемопоэз (НИМ)**. Как и предполагалось, НИМ индуцируют различные наборы факторов транскрипции, которые определяют путь отдельных клеток (Kluger et al., 2004).

Активированные НИМ транскрипционные факторы могут сдвигать равновесие генной сети стволовых клеток в разных направлениях (Krumisiek et al., 2011; Wontakal et al., 2012). Если свести все взаимодействия до петель отрицательной обратной связи и петель прямой связи (как активации, так и репрессии), окажется, что эта сеть может иметь только четыре стабильные конфигурации. В теории систем такие устойчивые состояния называют «аттракторами», они соответствуют четырем клеточным типам. Более того, определенные мутации делают определенные состояния аттракторов невозможными и именно эти мутации блокируют дифференциацию определенных типов клеток. Описанная схема дифференцировки клеток крови, проходящих через состояния с постепенно снижающимися потенциями, скорее всего, не применима ко всем периодам жизни. При изучении транскриптомов отдельных клеток установлено, что на более поздних стадиях развития человека не обнаруживаются стволовые клетки среднего уровня (такие как CMP) (Notta et al., 2016). Вполне возможно, что с возрастом образование клеток крови происходит непосредственно из ГСК.

Послесловие

Мы многого хотим от нашей системы кровообращения. Мы нуждаемся в строго определенном передвижении крови через клапаны каждую секунду жизни; нам требуется четкая координация между нашим мозгом, сердцем, костным мозгом и гормонами таким образом, чтобы сокращения сердечной мускулатуры подстраивались под наши физиологические потребности; нам необходимо, чтобы производство клеток крови (создаваемых из клеток-предшественников, которые возникли во время эмбриогенеза) было предельно точным и не приводило ни к раку, ни к анемии. Поэтому неудивительно, что дифференцировка клеток крови, развитие сердца, почек и кровеносных сосудов в настоящее время являются одними из наиболее важных областей исследования в медицинской науке. Пороки сердца — это одни из наиболее распространенных типов врожденных дефектов, а сердечно-сосудистые заболевания являются самой частой причиной смерти в индустриальных странах. Вопросы кардиогенеза, формирования почек, ангиогенеза и кроветворения, увлекавшие еще Аристотеля и Гарвея, до сих пор лежат в основе больших исследовательских программ.



© Vincent Pasque

О фотографии в начале главы

Сердечно-сосудистую систему цыпленка изучали веками (см. рис. 1.3). Эту флуоресцентную микрофотографию двухдневного куриного зародыша получили приблизительно через 45 ч после кладки яйца, когда сердце только начинает биться. Сосуды были выявлены с помощью инъекции флуоресцентных шариков в систему кровообращения. Сердце является первым функционирующим органом, но, как видно на фотографии, большая часть крови циркулирует во внезародышевой области, получая там питательные вещества из желтка и участвуя в обмене газов. Одно из первых событий в формировании сердца — установление полярности. Предсердия получают кровь, а желудочки ее прокачивают.

18

Коротко

Промежуточная мезодерма и мезодерма боковой пластинки

1. Промежуточная мезодерма формирует почки, надпочечники и гонады. Для ее спецификации требуются факторы *Pax2*, *Pax8* и *Lim1*, а также взаимодействие с параксиальной мезодермой.
2. Метанефрическая почка млекопитающих формируется за счет реципрокных взаимодействий метанефрической мезенхимы и ответвления почечного (Вольфова) протока, который называют зачатком мочеточника. Спецификация зачатка мочеточника и метанефрической мезенхимы основана на продолжительности воздействия сигналов *Wnt* и *FGF* на клетки-предшественники.
3. Метанефрическая мезенхима секретирует *GDNF*, который вызывает образование зачатка мочеточника.
4. Зачаток мочеточника секретирует *Fgf2*, *Fgf9* и *BMP7* для предотвращения апоптоза клеток метанефrogenной мезенхимы. Без этих факторов мезенхима, формирующая почку, погибает.
5. Зачаток мочеточника секретирует *Wnt9b* и *Wnt6*, которые побуждают компетентную метанефrogenную мезенхиму формировать эпителиальные каналы.

6. Мезодерма боковой пластинки расслаивается на два листка. Дорсальный слой представляет собой соматическую (париетальную) мезодерму, которая подстилает эктодерму и вместе с ней образует соматоплевру. Вентральный слой называют спланхической (висцеральной) мезодермой; она примыкает к энтодерме снаружи и вместе с ней образует спланхноплевру.
7. Пространство между двумя листками мезодермы боковой пластинки образует полость тела (целом).
8. Сердце позвоночных возникает из участков спланхической мезодермы на обеих боковых сторонах тела. Эту область называют кардиогенным полем или сердечной мезодермой. Ее спецификация происходит под влиянием BMP в отсутствие сигналов Wnt.
9. Транскрипционные факторы Nkx2–5, Mesp1 и Gata играют важную роль в превращении кардиогенной мезодермы в клетки сердца. Эти клетки-предшественники сердца мигрируют с боков к средней линии тела в области шеи.
10. На боковых сторонах тела находятся два основных кардиогенных поля. Каждое из них включает два отдела. Первичное кардиогенное поле формирует каркас сердечной трубки и левый желудочек. Остальная часть сердца образуется преимущественно из вторичного поля.
11. Кардиогенная клетка-предшественник может дать любую из основных клеточных линий сердца. Кардиогенная мезодерма образует эндокард (поверхность которого непосредственно продолжается в выстилку кровеносных сосудов) и миокард (мышечный компонент сердца).
12. Эндокардиальные трубки образуются отдельно, а затем сливаются воедино. Из-за образования петли исходная передне-задняя полярность сердечной трубки превращается в право-левую полярность.
13. Важную роль в детерминации передне-задней полярности сердца и почек играет ретиноевая кислота.
14. Транскрипционные факторы Tbx имеют решающее значение в спецификации камер сердца.
15. В развитии кровеносных сосудов выделяют два процесса: васкулогенез и ангиогенез. В ходе васкулогенеза происходит конденсация клеток спланхической мезодермы, формирующих кровяные островки. Наружные клетки островков становятся эндотелиальными (т. е. клетками стенки кровеносных сосудов). В ходе ангиогенеза существующие кровеносные сосуды перестраиваются.
16. Для формирования кровеносных сосудов необходимы многие паракринные факторы: Fgf2 — для спецификации гемангиобластов, VEGF-A — для дифференцировки ангиобластов. Ангиопоэтины позволяют гладкомышечным клеткам (и подобным им перикам) окружать сосуды.
17. Плюрипотентная гемопоэтическая стволовая клетка (ГСК) производит другие плюрипотентные стволовые клетки, а также стволовые клетки с более ограниченным (специализированной направленности) потенциалом. В результате образуются и кровяные клетки, и лимфоциты.
18. Считается, что у позвоночных ГСК происходят из гемогенных эндотелиальных клеток, что характерно для кровяных островков, дорсальной аорты и плацентарных сосудов. Мультипотентные (т. е. дефинитивные) ГСК, по-видимому, происходят из вентральной части аорты.
19. Общим миелоидным предшественником (CMP) является стволовая клетка крови, способная давать более коммитированные стволовые клетки для разных клеточных линий крови. Направление дифференцировки кровяных клеток зависит от микроокружения, индуцирующего гемопоэз (HIM).
20. ГСК зависят от фактора стволовых клеток (SCF), который предоставляют им в первую очередь периваскулярные клетки синусоидов, содержащихся в нише стволовых клеток.

Развитие конечности тетрапод

19

Сколько пальцев я показываю?



По данным: L. S. Honig and D. Summerbell, 1985.
J Embryol Exp Morphol 87: 163–174

Рассмотрите свою конечность. На одном конце руки или ноги находятся пальцы, а на другом, соответственно, локтевая кость или бедренная. Едва ли вам удастся найти кого-то с пальцами посередине руки. Постарайтесь еще обнаружить неуловимые, но очевидные различия между вашими руками и ногами. Если ваши пальцы на руках заменить пальцами ног, вы определенно заметите это. Несмотря на различия, кости ваших ног схожи с костями ваших рук. Легко заметить, что они имеют общий план строения. И наконец, заметьте, что обе ваших руки удивительно похожи по размеру, равно как и обе ваших ноги. Эти банальные феномены порождают увлекательные вопросы для биологов развития. Почему позвоночные имеют четыре конечности, а не шесть и не восемь? Почему мизинец развивается на одном краю конечности, а большой палец — на другом? Почему передние и задние конечности растут по-разному? Как может размер конечности регулироваться с такой точностью? Существует ли консервативный набор механизмов развития, объясняющий, почему на наших руках по пять пальцев, крыло у курицы — трехпалое, а копыт у лошади — одно?

Анатомия конечности

Как указывает название, тетраподы — позвоночные с четырьмя конечностями (земноводные, рептилии, птицы и млекопитающие). Кости любой конечности тетрапод — будь то рука или нога, крыло или лапа — состоят из проксимального стилоподия (плечевая/бедренная кость), прилегающего к стенке тела, зигоподия (лучевая — локтевая/берцовая — малая берцовая кость) в средней части и дистального аутоподия (кистевые кости — пальцы руки/предплюсневые

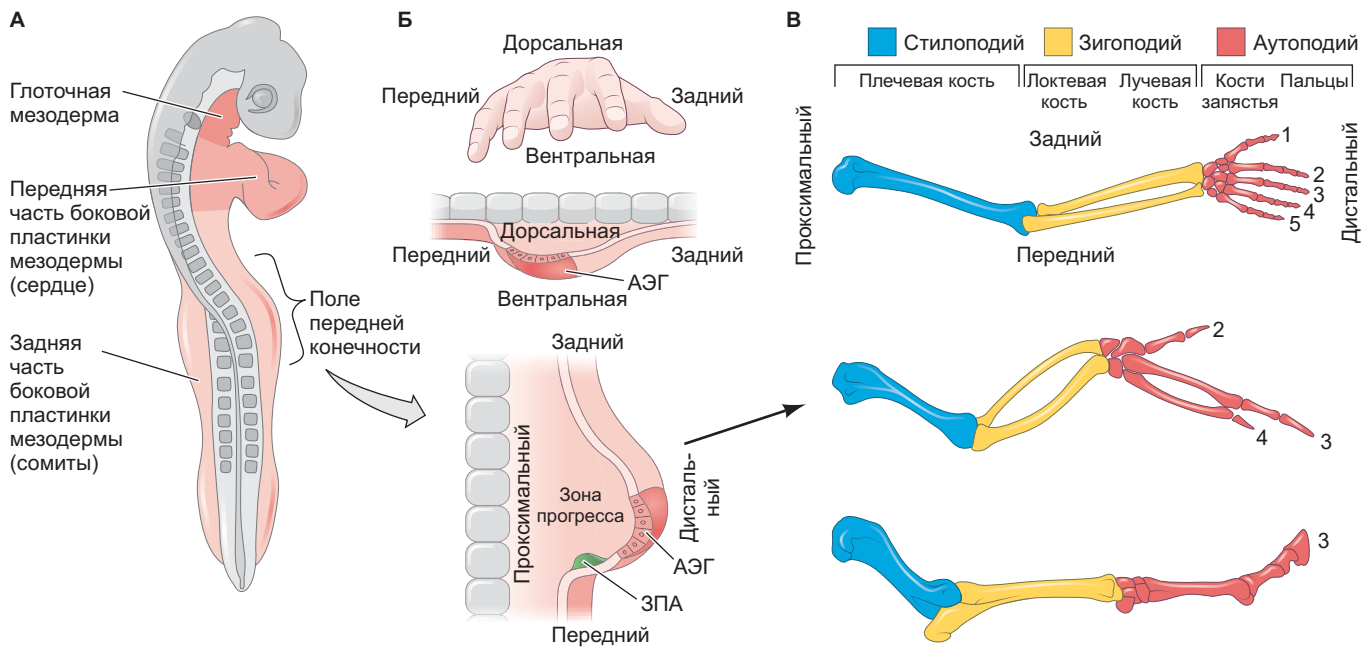


Рис. 19.1. Анатомия конечности. **А.** На схеме куриного зародыша непосредственно перед началом роста конечности показаны три значимых типа мезодермальных клеток, а также появление поля конечности. **Б.** Ориентация осей и строение почки конечности. АЭГ — апикальный эктодермальный гребень; ЗПА — зона поляризующей активности. **В.** Организация скелета руки человека, крыла курицы и передней конечности лошади. Общепринята нумерация пальцев в крыле курицы, в которой они соответствуют 2, 3 и 4. Хрящевые уплотнения, формирующие пальцы, выглядят схожими с уплотнениями, образующими пальцы 2, 3 и 4 у мыши и человека, однако новые доказательства свидетельствуют, что правильной может быть нумерация 1, 2 и 3. (Рис. А по данным: M. Tanaka, 2013. *Dev Growth Differ* 55: 149–163; рис. Б по данным: M. Logan, 2003. *Development* 130: 6401–6410.)

кости — пальцы ноги) (рис. 19.1)¹. Пальцы рук и ног можно назвать фалангами. Позиционная информация, необходимая для построения конечности, должна функционировать в трехмерной² системе координат:

- Первое измерение — *проксимально-дистальная ось* («ближе — дальше», т. е. от плеча к пальцам руки или от бедра к пальцам ноги). Кости конечности формируются путем эндохондрального окостенения. Изначально они имеют хрящевую природу, но в конечном счете большая часть хряща замещается костью. Каким-то образом клетки конечности при построении стилоподия делают ее части иной формы, чем при создании аутоподия.

- Вторая ось — передне-задняя (от большого пальца к мизинцу). Наши мизинцы расположены на заднем конце оси конечности, а большие пальцы — на переднем. Очевидно, что у человека каждая рука развивается как зеркальное отражение другой руки. Можно

представить другую организацию — когда большой палец развивается слева на обеих руках, но такой паттерн не встречается.

- Наконец, конечности имеют дорсально-вентральную ось: наша ладонь (вентральная) явно отличается от тыльной стороны кисти (дорсальной).

Почка конечности

Первым видимым ознаменованием развития конечности является формирование у зародыша парных выпуклостей, называемых **почками конечностей**, расположенных на месте презумптивных передних и задних конечностей (рис. 19.2А). Работы на тритонах по картированию путей развития клеток, впервые выполненные лабораторией Росс Гранвилл Харрисон (Harrison, 1918; 1969), показали, что центр этого диска из клеток в соматическом листке боковой пластинки мезодермы в норме дает начало конечности как таковой. К нему прилегают клетки, формирующие перибрахияльную (вокруг конечности) фланкирующую ткань и плечевой пояс. Однако, если клетки удалить из зародыша, конечность все равно сформи-

¹ Эти термины могут быть сложны для запоминания, но поможет знание их происхождения. *Stylo* — подобный столбу, *zeugo* — соединяющий, *auto* — собственно, *pod* — нога.

² На самом деле это четырехмерная система, в которой четвертая ось — время. Биологи развития привыкли видеть природу в четырех измерениях.

грируют в поле конечности с целью сформировать клетки-предшественники *скелета* конечности, тогда как мезенхимные клетки сомитов на том же уровне (вдоль переднезадней оси тела. — *Прим. перев.*) мигрируют, чтобы дать начало *мышечным* клеткам-предшественникам (рис. 19.2Б, В). Накапливающаяся гетерогенная популяция мезенхимных клеток пролиферирует под эктодермальной тканью, образуя почку конечности.

Даже на начальных этапах развития почка конечности имеет такую организацию, что рост происходит в основном по проксимально-дистальной оси (в направлении от сомитов к эктодерме) и в меньшей степени вдоль дорсально-вентральной и передне-задней осей (рис. 19.1Б). В дальнейшем почка конечности подразделяется на три функционально различных домена:

- 1) пролиферативно активную мезенхиму, обеспечивающую рост почки конечности, известную как мезенхима **зоны прогресса** (ЗП) (также называемая недифференцированной зоной);
- 2) клетки, находящиеся в более задней части зоны прогресса, составляют **зону поляризующей активности** (ЗПА), поскольку они определяют паттерн клеточных судеб вдоль передне-задней оси;
- 3) **апикальный эктодермальный гребень** (АЭГ), представляющий собой утолщение эктодермы на верхушке развивающейся почки конечности (рис. 19.2Г).

Дифференцировка скелета конечности за счет Нох-генов

Гомеобоксодержащие транскрипционные факторы, или Нох-гены, играют особую роль в спецификации мезенхимных клеток конечности, независимо от того, сформируется ли в результате стилоподий, зигоподий или аутоподий. Открытие их роли дало исследователям понимание процессов развития и эволюции конечности позвоночных на принципиально новом уровне.

От проксимального к дистальному: Нох-гены в конечности

Основываясь на паттернах экспрессии комплексов генов *Нох* и *Нохд* в почке конечности у мыши, сотрудники лаборатории Капеччи (Davis et al., 1995) предложили модель, согласно которой эти Нох-гены определяют индивидуальность области конечности (рис. 19.3А, Б). Так, паралоги *Нох9* и *Нох10* определяют развитие стилоподия, паралоги *Нох11* отвечают за спецификацию зигоподия, а паралоги *Нох12* и *Нох13* — за аутоподий. Этот сценарий был подтвержден многочисленными экспериментами. Например, когда все шесть аллелей трех паралогов *Нох10*

(*Нох10aacdd*) были нокаутированы у зародышей мыши, задние конечности полученных зародышей были лишены бедренной кости и надколенника, которые в норме формируются из стилоподии. Передние конечности, однако, имели плечевую кость, так как паралоги *Нох9* экспрессируются в стилоподии передней конечности, но не в стилоподии задней (Wellik and Capreschi, 2003). При нокауте всех шести аллелей трех паралогов *Нох11* образующиеся задние конечности имели бедренную кость, но не берцовую и не малую берцовую кости (а передние конечности были лишены локтевой и лучевой костей). Так, нокаут по *Нох11* лишил конечность зигоподия (рис. 19.3В). Схожим образом нокаутирование всех паралогов локуса *Нох13* и *Нохд13* приводило к утрате аутоподия (Fromental-Ramain et al., 1996). Люди, гомозиготные по мутации *HOXD13*, имеют аномальные руки и ноги, на которых сливаются пальцы (рис. 19.3Г), а люди с гомозиготными мутантными аллелями *HOXA13* имеют и деформации аутоподий (Muragaki et al., 1996; Mortlock and Innis, 1997). И у людей, и у мышей аутоподий (наиболее дистальная часть конечности) страдает при утрате функции большинства 5'-Нох-генов.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

От плавников к пальцам: Нох-гены и эволюция конечности

Как придатки скелета позвоночных эволюционировали в конечности, которые мы находим столь удобными сейчас? Ископаемые окаменелости указывают на важный переход в строении передней конечности — от грудных плавников лучеперых рыб к конечностям тетрапод, имеющим пальцы; переход, предоставивший возможность водным формам жизни осваивать сухопутную среду обитания. Понимание истории эволюции конечности тетрапод может помочь нам анализировать механизмы развития, необходимые для формирования структуры современной конечности. Открытие девонских окаменелостей *Tiktaalik roseae*, «рыбы с пальцами», подчеркнуло важность развития суставов в эволюции конечности. Плавники рыб, включая таковые у некоторых наиболее примитивных видов, развиваются с использованием тех же самых трех фаз экспрессии Нох-генов, которые тетраподы используют при формировании конечностей (Davis et al., 2007; Ahn and Ho, 2008). Независимое преобразование костей плавников в кости конечности могло стать возможным благодаря суставам. Суставы грудных плавников *Tiktaalik* очень схожи с таковыми у амфибий и демонстрируют, что *Tiktaalik* имеет подвижные запястья и положение с упором на основу, при котором плечо и локоть могут сгибаться (рис. 19.4; Shubin et al., 2006; Shubin, 2008). К тому же, наличие структур, подобных запястью,

и утрата кожных чешуй в этих областях подтверждают, что девонские рыбы были способны передвигаться самостоятельно по влажной поверхности. Так, *Tiktaalik* является предполагаемым переходным представителем, стоящим между рыбами и земноводными, — «рыбоног, способный отжиматься», как назвал его один из первооткрывателей Нил Шубин.

Какие типы молекулярных и морфологических изменений могли происходить у разных эволюционных линий, чтобы появились лучеперые рыбы, с одной стороны, и сухопутные тетраподы — с другой? У рыб, наиболее близких к тетраподам (лопастеперых рыб, таких как целаканты и двоякодышащие), наиболее проксимальные кости грудного

плавника гомологичны сегменту стилоподия передней конечности тетрапод и схожим образом ответственны за сочленение вокруг грудного пояса или плеча. Однако плавники лучеперых рыб различаются по форме, и это отчетливо заметно по самым дистальным элементам, в частности аутоподию (пальцам). Лучеперые рыбы лишены эндоскелета, связанного с аутоподием, тогда как анцестральные рыбы из клады Sarcopterygii (мясистоластные) имеют развитый эндохондральный скелет в плавниках (как у *Tiktaalik*). Таким образом, механизмы развития наиболее дистального отдела конечности, нацеленные на адаптацию, были основой для ее эволюции.

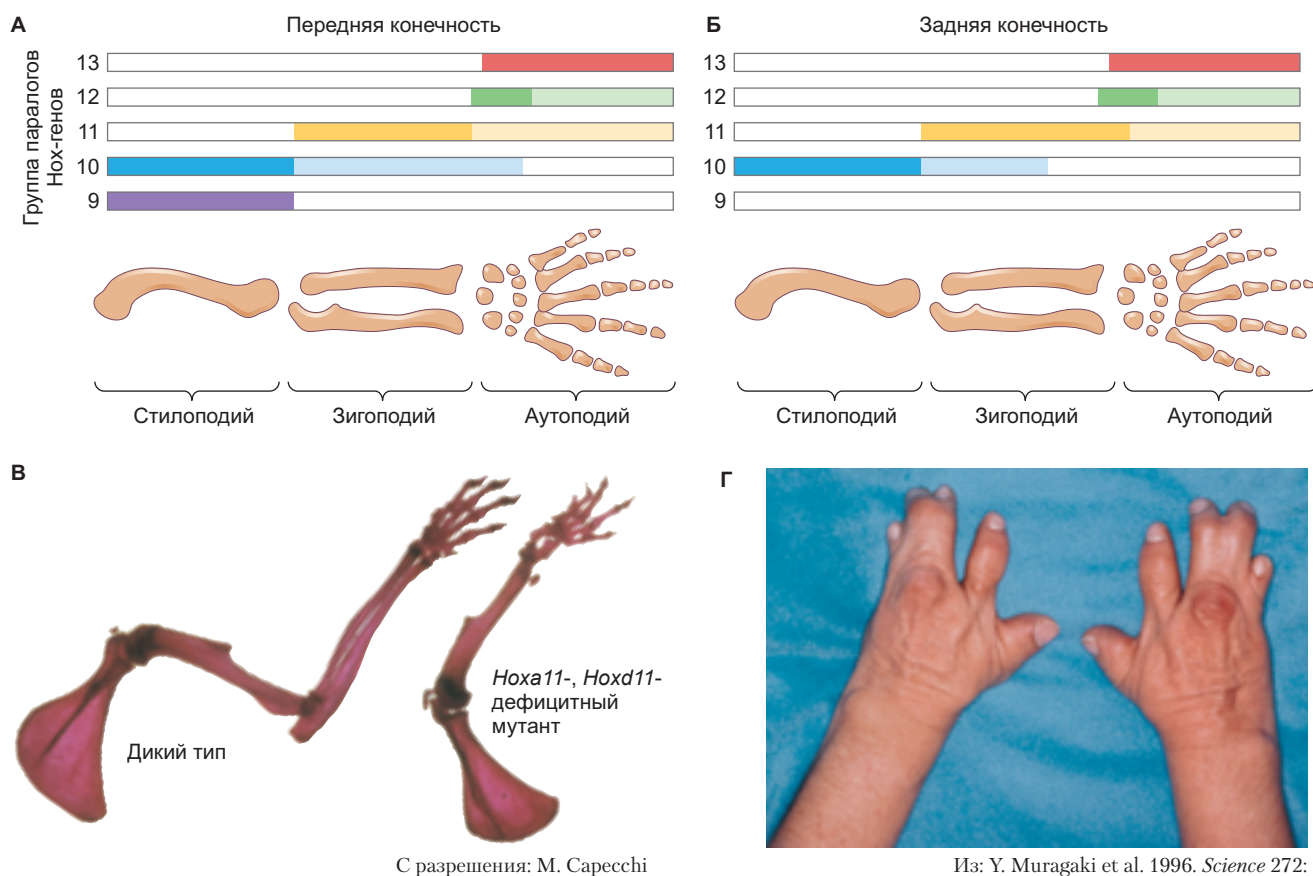


Рис. 19.3. Удаление костных элементов конечности путем удаления паралофов Нох-генов. **А.** Структурирование передней конечности с помощью 5'-Нох-генов. Паралоги *Hox9* и *Hox10* отвечают за спецификацию плечевой кости (стилоподий). Паралоги *Hox10* в меньшей степени экспрессируются в локтевой и лучевой костях (зигоподий). Паралоги *Hox11* главным образом отвечают за структурирование зигоподия. Паралоги *Hox12* и *Hox13* работают в аутоподии, притом паралоги *Hox12* функционируют в первую очередь в запястье и в меньшей степени в пальцах. **Б.** Схожий, но местами отличный паттерн наблюдается в задней конечности. **В.** Задняя конечность мыши дикого типа (слева) и двойной мутант, лишенный функций генов *Hoxa11* и *Hoxd11* (справа). Локтевая и лучевая кости сильно укорочены или вовсе отсутствуют у мутанта. **Г.** Полисиндактилия у человека (несколько пальцев, соединенных вместе), развивающаяся вследствие гомозиготной мутации по локусу *HOXD13*. Этот синдром включает также пороки развития уrogenитальной системы, в которой экспрессируется и *HOXD13*. (Рис. А, Б по данным: D. M. Wellik and M. R. Capecchi, 2003. *Science* 301: 363–367.)

Мы надеемся, что беглое описание эволюции конечности тетрапод от плавников рыб до руки человека показало важность регуляции Нох-генов во время развития конечности. Нох-гены критически важны для определения пути развития клеток по каждой из осей конечности, и их экспрессию контролируют сигналы, испускаемые сбоку (проксимальный) и из АЭГ (дистальный), помимо прочих областей. Что это за сигналы и как они работают, чтобы: 1) определить форму конечности; 2) обеспечить рост и структурирование почки конечности; 3) определить пути развития клеток вдоль передне-задней и дорсально-вентральной осей?

Как определить, какую конечность формировать и где ее расположить

Конечность не такой жизненно необходимый для эмбрионального или фетального развития орган, как сердце или мозг, поэтому можно экспериментально удалить или трансплантировать части развивающейся конечности либо создать мутантов по генам, ответственным за развитие конечности, не влияя при этом на жизненные процессы организма. Такие эксперименты показали, что базовые «морфогенетические правила» для формирующейся конечности оказались одинаковыми для всех тетрапод. Пересаженная часть почки конечности рептилии или млекопитающего способна запускать формирование конечности у курицы, и области, взятые от почки конечности у лягушки, могут управлять формированием конечности тритона (Fallon and Crosby, 1977; Sessions et al., 1989; Hinchliffe, 1991). Более того, регенерирующая конечность саламандры, как оказалось, во многом следует тем же пра-

вилам, что и развивающаяся конечность (см. гл. 22; Muneoka and Bryant, 1982). Что же это за морфогенетические правила?

Спецификация полей конечности

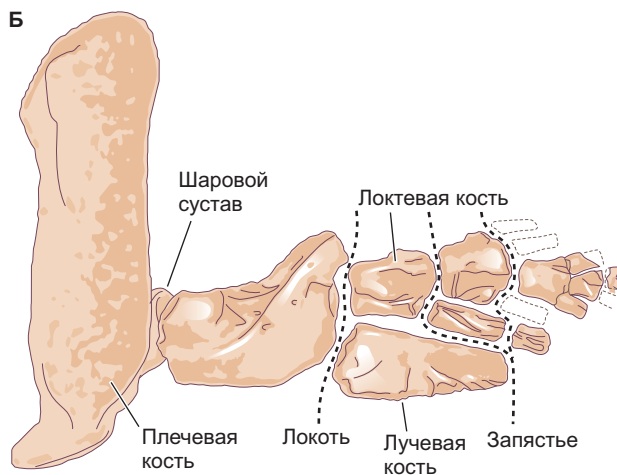
Конечности образуются не хаотично вдоль осей тела, а только в определенных местах. Ранние эксперименты по картированию клеточного развития и трансплантациям у курицы показали, что существует два специфичных региона, или поля, сомитной и боковой пластинки мезодермы, детер-

А



© John Weinstein/Field Museum Library/Getty Images

Б



В

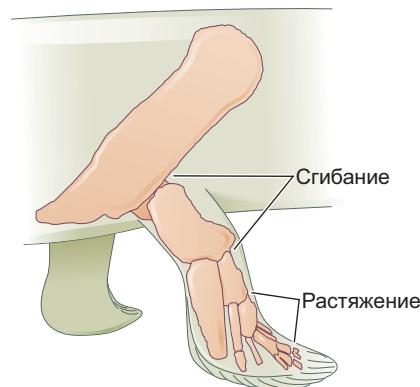


Рис. 19.4. Эволюция конечности. **А.** Рыба *Tiktaalik roseae* с запястьями и пальцами, жившая на мелководье примерно 375 млн лет назад. На реконструкции показаны рыбы жаберы, плавники, чешуя, но отсутствует шея. Однако наружные ноздри на ее морде подтверждают, что создание могло дышать воздухом. **Б.** Ископаемые кости *Tiktaalik* имеют зачатки пальцев, запястий, локтей и плечевых костей. Это наводит на мысль о том, что эта земноводноподобная рыба могла самостоятельно перемещаться по дну проточного водоема и, возможно, обитает на суше в течение коротких промежутков времени. Суставы плавника включали шаровой сустав в плече и плоский сустав, позволяющий запястью изгибаться. Другие суставы помогали животному забираться на субстрат. **В.** Устойчивый контакт с основой позволил бы осуществлять сгибание в проксимальных суставах (плечо и локоть) и растяжение в дистальных суставах (запястье и пальцы). (Рис. Б, В по данным: N. H. Shubin et al., 2006. *Nature* 440: 764–771.)

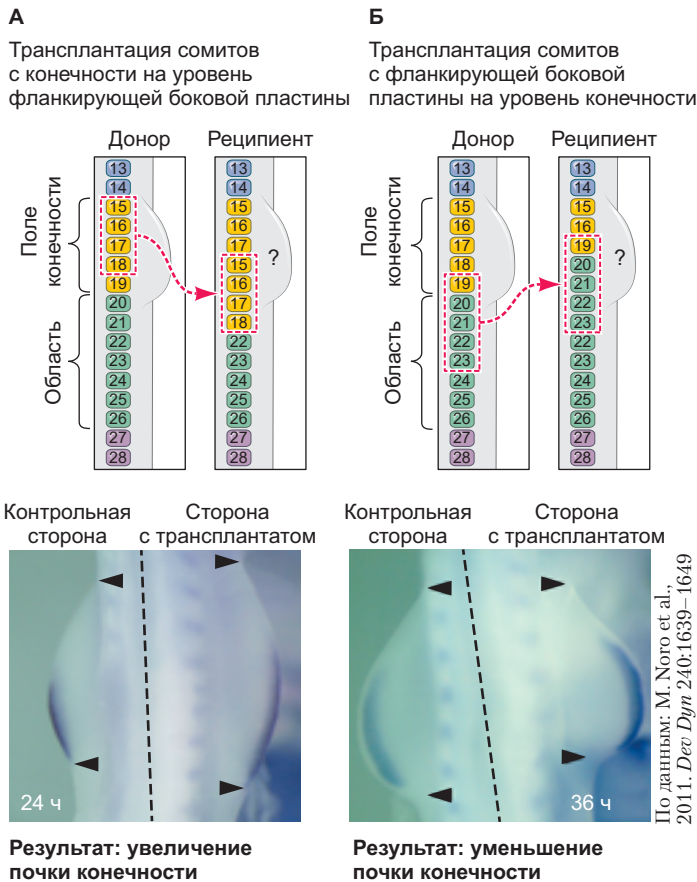


Рис. 19.5. Трансплантация разных участков пресомитной мезодермы (ПСМ) к полю конечности приводит к изменению размера конечности. **А.** Трансплантация ПСМ с уровня презумптивной передней конечности в область между передней и задней конечностями приводит к увеличению почки передней конечности (область между концами стрелок). **Б.** Трансплантация ПСМ из области между передней и задней конечностями на уровень презумптивной передней конечности приводит к уменьшению почки передней конечности. (По данным: M. Noro et al., 2011. *Dev Dyn* 240: 1639–1649.)

минированные к формированию конечности задолго до появления каких бы то ни было видимых признаков крыльев или ног. Мезодермальные клетки, дающие начало конечности позвоночных, были идентифицированы путем: 1) удаления определенных групп клеток и наблюдения, что конечность не развивается в их отсутствие («утрата»; Detwiler, 1918; Harrison, 1918); 2) трансплантации групп клеток в новое положение и наблюдения, что они формируют конечность в этом новом месте («перемещение»; Hertwig, 1925); 3) маркировки групп клеток витальным красителем или радиоактивным предшественником и наблюдения, что потомки этих клеток принимают участие в развитии конечности («обнаружение»; Rosenquist, 1971).

У позвоночных закладывается не более четырех почек конечности на зародыш, и расположены они всегда попарно, друг напротив друга относительно средней линии зародыша. Хотя конечности разных позвоночных различаются по уровню сомитов, на котором они образуются, их положение неизменно по уровню Нох-генов, экспрессирующихся вдоль передне-задней оси (см. гл. 12). В частности, у рыб (грудной и брюшной плавники которых соответствуют передней и задней конечности), у земноводных, птиц и млекопитающих почка передней конечности находится в наиболее передней части зоны экспрессии *Нохс6*, на уровне первого грудного позвонка (Oliver et al., 1988; Molven et al., 1990; Burke et al.,

1995)¹. Возможно, позиционная информация в виде доменов экспрессии Нох-генов служит причиной формирования различий между параксиальной мезодермой в месте формирования конечности и всей остальной параксиальной мезодермой. Эксперименты по трансплантации, в которых параксиальную мезодерму (сомиты) с разных уровней пересаживали к фланкирующей боковой пластинке (т. е. в интервале между передней и задней конечностями), показали, что параксиальная мезодерма из области формирования конечности активирует закладку почки конечности, тогда как параксиальная мезодерма из других прилегающих областей активно подавляет формирование конечности (рис. 19.5; Noro et al., 2011).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Потенции почки конечности

На момент своего формирования поле конечности способно к регуляции в ответ на утрату или приобретение дополнительных частей. У пятнистой

¹ Любопытно, что экспрессия Нох-генов по крайней мере у некоторых змей (таких как *Python*) создает паттерн, в котором каждому сомиту предопределено стать торакальным (грудным) позвонком. Паттерн экспрессии Нох-генов, связанный с областями формирования конечностей, у змей не выявлен (см. гл. 17; Cohn and Tickle, 1999).

саламандры *Ambystoma maculatum* на стадии хвостовой почки любая половина диска конечности способна сформировать полноценную конечность при пересадке ее на новое место (Harrison, 1918). Эта способность может быть продемонстрирована путем разделения диска конечности вертикально на два или более сегментов и помещения барьера между сегментами, который препятствовал бы их обратному объединению. В такой ситуации каждый сегмент развивается в полноценную конечность. Так, подобно раннему зародышу морского ежа, поле конечности являет собой «гармоничную эквипотенциальную систему», в которой клетка может быть направлена на путь формирования любой части конечности. Пластичность почки конечности подчеркнули примечательные эксперименты самой природы. В разнообразных прудах на территории США были обнаружены многоногие лягушки и саламандры (рис. 19.6). Наличие дополнительных конечностей было связано с заражением брюшка личинок паразитическими трематодами, которые, по-видимому, рассекали развивающиеся почки конечностей головастика, и фрагменты почки конечности формировались как отдельные конечности (Sessions and Ruth, 1990; Sessions et al., 1999).

Индукция ранней почки конечности

Становление предварительной структуры тканевой идентичности, в том числе расположение полей конечностей, происходит за счет дифференциальной



С разрешения: S. Sessions

Рис. 19.6. Многоногая тихоокеанская древесная лягушка *Hyla regilla*, появившаяся в результате заражения развивающихся почек конечностей на стадии головастика цистами трематод. Цисты паразита, по-видимому, разделили развивающиеся почки конечностей на несколько фрагментов, что привело к образованию дополнительных ног. На этом скелете взрослой лягушки хрящ окрашен синим, кости — красным

экспрессии Нох-генов вдоль передне-задней оси туловища, но какие же механизмы запускают затем инициацию формирования почки конечности? Этот процесс может быть разделен на четыре стадии: 1) становление мезодермы перmissive к формированию конечности; 2) спецификация передних и задних конечностей; 3) индукция эпителио-мезенхимных переходов; 4) становление двух положительных петель обратной связи для формирования почки конечности.

СТАДИЯ 1. МЕЗОДЕРМА ПРИОБРЕТАЕТ СПОСОБНОСТЬ ФОРМИРОВАТЬ ПЕРЕДНЮЮ КОНЕЧНОСТЬ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ

В гл. 17 мы рассмотрели антагонистические взаимоотношения ретиновой кислоты (РК) и Fgf8 в ходе сомитогенеза. Напомним, что Fgf8 экспрессируется в каудальной (задней) прогениторной зоне, граничащей сзади с полем передней конечности; Fgf8 образует градиент с источником сзади, в пресомитной мезодерме. РК, наоборот, образуется в передней части тела, в сомитах и передней пресомитной мезодерме. При развитии передней конечности Fgf8 тоже экспрессируется непосредственно спереди от поля передней конечности, в мезодерме боковой пластинки сердца (рис. 19.7). Исследования развития конечностей курицы и мыши, а также грудных плавников у *Danio rerio*, позволили предположить, что в результате передней и задней экспрессии Fgf8 происходит ингибирование закладки почки передней конечности (Tanaka, 2013; Cunningham and Duester, 2015). К примеру, эксперименты по усилению функций Fgf8, выполняемые путем его непосредственного применения либо конститутивной активации рецепторов к FGF (FGFR), приводят к исчезновению поля передней конечности (что определяют по отсутствию экспрессии *Tbx5*; см. рис. 19.7B) и укорочению конечностей (Marques et al., 2008; Cunningham et al., 2013).

РК, наоборот, присутствует в сомитных областях туловища, непосредственно граничащих с полем передней конечности, где она необходима для подавления экспрессии Fgf8 в туловище и, таким образом, разрешения закладки почки передней конечности. Целенаправленное подавление синтеза РК (путем мутации или ингибирования фармакологическими агентами) в передней конечности позвоночных приводит к распространению зоны экспрессии Fgf8 на презумптивное поле передней конечности, уменьшению экспрессии *Tbx5* и утрате возможности формирования почки передней конечности; все данные проявления соответствуют эктопическому усилению сигнального каскада Fgf8. Поскольку РК действует как лиганд транскрипционного фактора и было показано прямое подавление транскрипции гена *Fgf8* (Kumar and Duester, 2014), согласно дей-

ствующей модели, закладка почки передней конечности инициируется ограничением РК экспрессии Fgf8 в презумптивной области закладки конечности. В отсутствие Fgf8 боковая пластинка мезодермы способна к формированию почки передней конечности и дальнейшему развитию (рис. 19.8А, Tanaka, 2013; Cunningham and Duester, 2015).

Несмотря на то что антагонизм между РК и Fgf8 играет роль в закладке передней конечности и на ранних этапах сомитогенеза, присутствие РК совсем не обязательно для развития задней конечности. Подавление синтеза РК у мышей не оказывало влияния на формирование почки задней конечности, и средний размер и строение задней конечности оставались в пределах нормы (Cunningham et al., 2013). Таким образом, сигнальные механизмы, регулирующие закладку почки задней конечности, остаются на сегодняшний день неизвестными.

СТАДИЯ 2. СПЕЦИФИКАЦИЯ ПЕРЕДНЕЙ И ЗАДНЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ ЗА СЧЕТ TBX5 И ISLET1

Раннее становление идентичности передней и задней конечностей начинается в поле конечности с формирования почки посредством экспрессии определенных транскрипционных факторов (Agarwal et al., 2003; Grandel and Brand, 2011). У мыши ген, кодирующий Tbx5, транскрибируется в поле передней конечности, тогда как гены, кодирующие Islet1, Tbx4 и Pitx1, экспрессируются в презумптивной задней конечности (Chapman et al., 1996; Gibson-Brown et al., 1996; Takeuchi et al., 1999; Kawakami et al., 2011)¹. Ниже в регуляторной иерархии, по отношению к этим транскрипционным факторам, находится Fgf10, первичный индуктор формирования почки конечности за счет изменения формы клеток и пролиферации при росте (рис. 19.8Б, В).

В ряде лабораторий (Logan et al., 1998; Ohuchi et al., 1998; Rodriguez-Esteban et al., 1999; Takeuchi et al., 1999) было показано, что Tbx4 и Tbx5 являются ключевыми факторами в спецификации задних и передних конечностей соответственно. Еще до формирования конечности в задней части боковой пластинки мезодермы (включая область, в которой будет формироваться задняя конечность) в норме существует домен экспрессии Tbx4, а в передней части боковой пластинки (включая область, в которой будет формироваться передняя конечность) — домен экспрессии Tbx5. Если с помощью шариков, выделяющих Fgf10, индуцировать эктопическую конечность между передней и задней конечностями у курицы (рис. 19.9А, Б), то тип образующейся

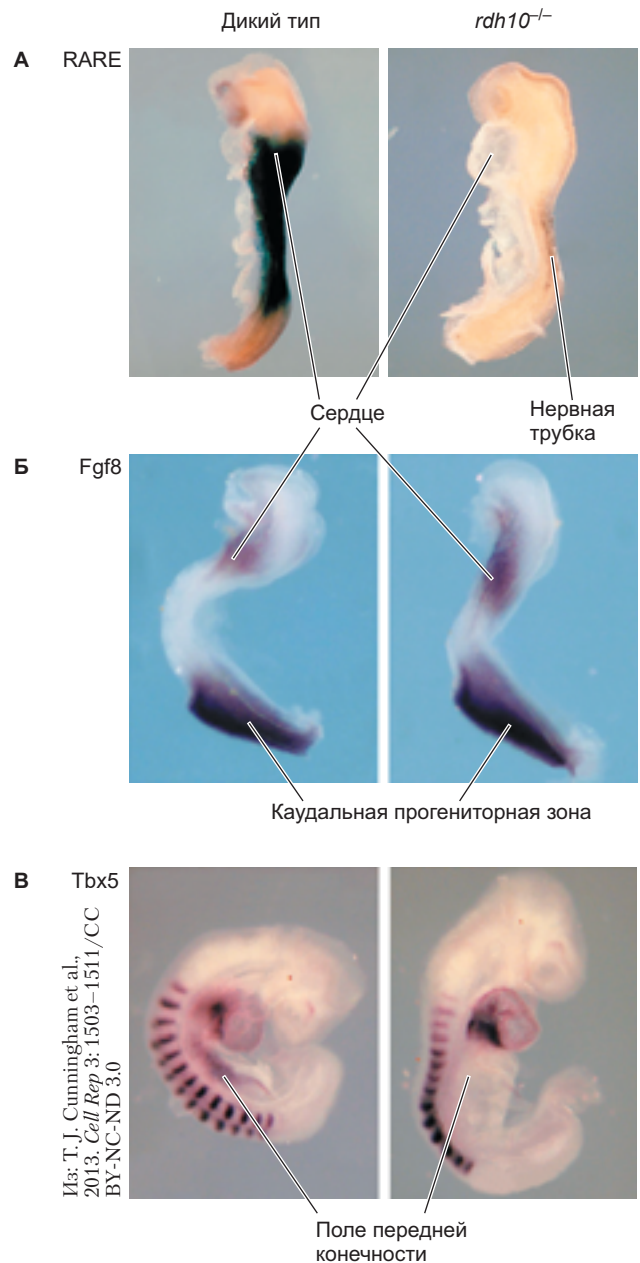
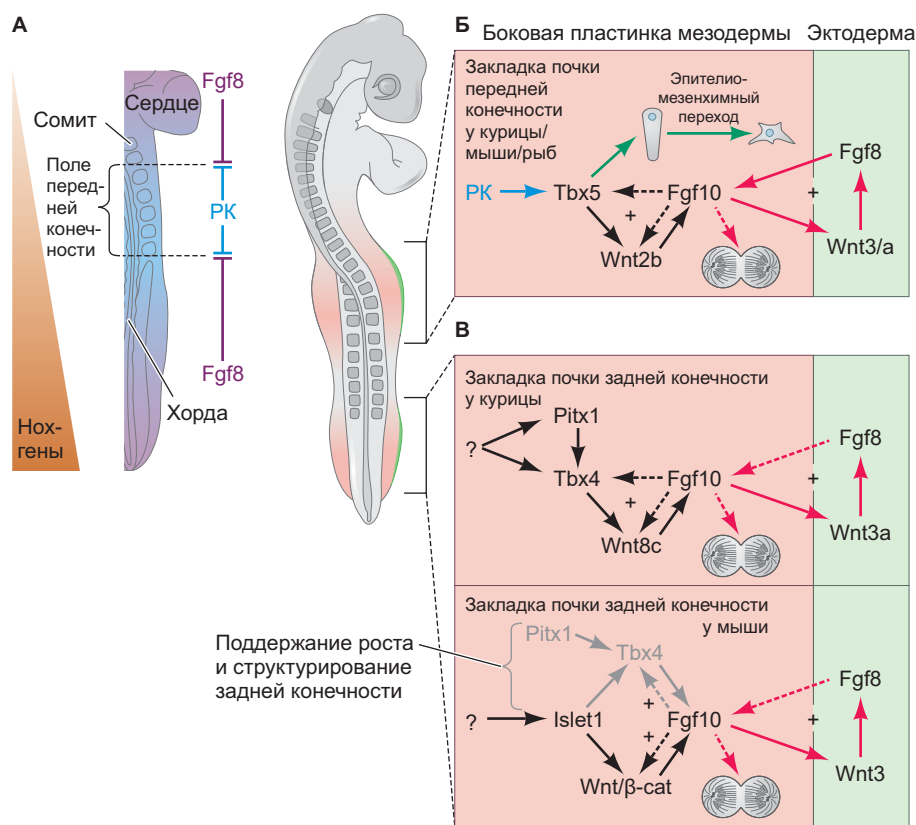


Рис. 19.7. Антагонизм между РК и Fgf8 определяет паттерн экспрессии Tbx5 в поле передней конечности у мыши. Как видно на контрольных зародышах (слева), экспрессия репортера, находящегося под контролем регуляторного элемента РК (RARE), падает непосредственно между доменами экспрессии Fgf8 в сердце (спереди) и в каудальной прогениторной зоне. **А.** Экспрессия репортера, находящегося под контролем RARE, почти полностью подавлена при утрате фермента ретинальдегиддегидрогеназы 10 (мутант по *rdh10*, справа), за исключением минимальной экспрессии в нервной трубке. **Б.** Утрата *Rdh10*, наоборот, приводит к распространению паттерна экспрессии Fgf8 на осевую область, обычно занятой ретиноевой кислотой. **В.** Подавление сигнализации через РК путем выключения *Rdh10* приводит также к ослаблению экспрессии Tbx5 в поле передней конечности

¹ Tbx содержит специфичный ДНК-связывающий домен Т-box. Ген *T* (*Brachyury*) и сходные с ним гены содержат последовательность, кодирующую этот домен. Мы обсуждали Tbx5 в контексте развития желудочков сердца в гл. 18.

Рис. 19.8. Модель закладки поля передней конечности. **А.** В начале осевая экспрессия Нох-генов регулирует экспрессию *Fgf8* и РК, которые работают как антагонистичные сигналы, индуцирующие экспрессию *Tbx5* для закладки поля передней конечности. **Б.** Модель петель положительной обратной связи между сигнальными факторами, обеспечивающими развитие передней конечности у разных видов. **В.** Многие из факторов, необходимых для паттернирования развивающейся задней конечности, у курицы и мыши не только идентичны, но и образуют петли положительной обратной связи в сигнальных каскадах. Однако некоторые из них работают по-разному; в частности, *Islet1* необходим для развития задней конечности у мыши, но не у курицы. (Рис. А по данным: T. J. Cunningham and G. Ducrest, 2015. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 110–123.)



в результате этого конечности будет определяться тем, какой из белков *Tbx* экспрессировался. Почка конечности, индуцированная помещением шарика с FGF вблизи задней конечности (на уровне сомита 25), экспрессировала *Tbx4* и становилась задней конечностью. Почка конечности, индуцированная вблизи передней конечности (на уровне сомита 17), экспрессировала *Tbx5* и развивалась в крыло. Почка конечности, индуцированная между местами закладки передней и задней конечностей, экспрессировала *Tbx5* в передней своей части и *Tbx* в задней; такие конечности развивались в химерные структуры, у которых передняя часть напоминала переднюю конечность, а задняя — заднюю (рис. 19.9В–Д). Более того, если заставить куриный зародыш экспрессировать *Tbx4* в промежутке между местами закладки передней и задней конечностей (путем инфицирования ткани вирусом, экспрессирующим *Tbx4*), то конечность, формирующаяся в передней части этого участка, часто становится ногой вместо крыла (рис. 19.9Е, Ж).

Позже было получено подтверждение критичности *Tbx5* для закладки и спецификации почки передней конечности: утрата гена *Tbx5* у курицы, мыши и рыб приводила к полной невозможности формирования передней конечности вплоть до проксимальных структур плечевого пояса (Garrity et al., 2002; Agarwal et al., 2003; Rallis et al., 2003). Однако роль *Tbx4* в спецификации задней конечности может различаться у курицы и у мыши. У курицы утрата

функции *Tbx4* в поле задней конечности полностью подавляет закладку и рост ноги (Takeuchi et al., 2003); у мыши рост почки задней конечности и формирование начального паттерна происходили нормально при нокауте по *Tbx4* (Naiche and Papaioannou, 2003), хотя развитие ноги преждевременно прекращалось. Это наблюдение показывает, что у мыши *Tbx4* в норме необходим скорее для поддержания роста задней конечности, чем для ее закладки.

В последних работах обнаружены два дополнительных транскрипционных фактора *Pitx1* и *Islet1*, вовлеченных в закладку задней конечности. Действительно, эктопическая экспрессия *Pitx1* в передней конечности у мыши приводит к тому, что развивающиеся мышцы, кости и сухожилия напоминают таковые задней конечности (Minguillon et al., 2005; DeLaurier et al., 2006; Ouimette et al., 2010); экспрессия *Tbx4* в передней конечности мыши не приводит к такому эффекту. Кроме того, белок *Pitx1* активирует в передней конечности гены, характерные для задней, такие как *Hoxc10* и *Tbx4*. Любопытно, что мутация в гене *PITX1* у человека, приводящая к гаплонедостаточности по белку *Pitx1*, вызывает двустороннюю косолапость (Alvarado et al., 2011). Эти результаты демонстрируют, что *Pitx1* достаточен для спецификации задней конечности; впрочем, ни полной утраты задней конечности, ни серьезных нарушений ее строения у *Pitx1*^{-/-} мышей не наблюдается, хотя некоторые структуры задней конечности все же формируются неправильно (Duboc

and Logan, 2011). Это наблюдение подтверждает вероятность участия еще и другого фактора. В поле задней конечности мыши еще до экспрессии *Fgf10* и формирования почки конечности кратковременно экспрессируется гомеодоменсодержащий транскрип-

ционный фактор *Islet1* (Yang et al., 2006). При специфичной инактивации *Islet1* в боковой пластинке мезодермы задняя конечность не формируется, что согласуется с его ролью в закладке задней конечности (Itou et al., 2012). Транскрипционная регуля-

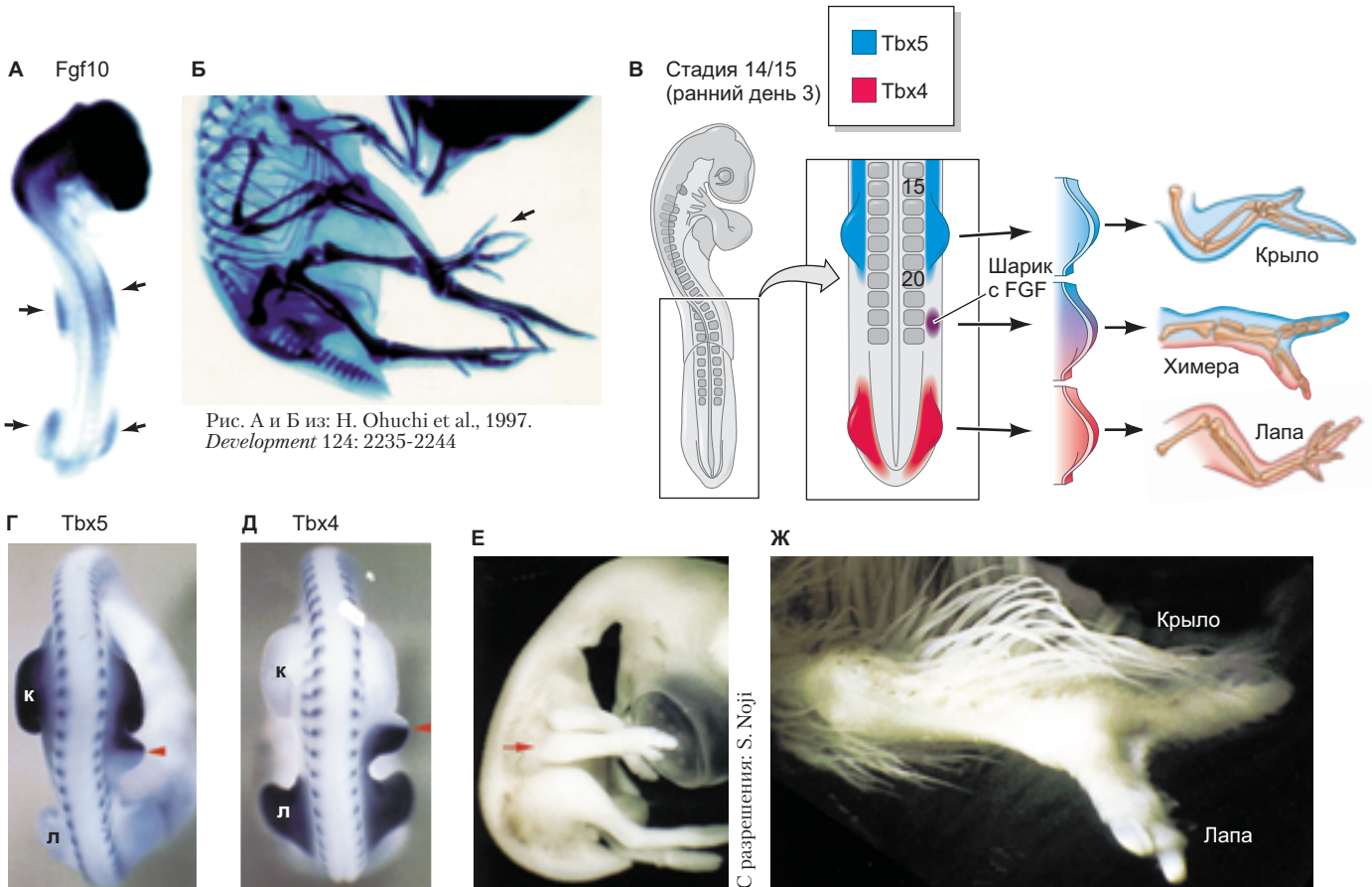


Рис. Г и Д из: Н. Ohuchi et al., 1998. *Development* 125: 51–60, с разрешения S. Noji

Из: Н. Ohuchi and S. Noji, 1999. *Cell Tissue Res* 296: 45–56

Рис. 19.9. Экспрессия и действие *Fgf10* в развивающейся конечности курицы. **А.** *Fgf10* экспрессируется в боковой пластинке мезодермы именно в тех местах (отмечены стрелками), где в норме формируются конечности. **Б.** Если трансгенные клетки, секретирующие *Fgf10*, поместить в области, фланкирующие почку конечности куриного зародыша, *Fgf10* может привести к формированию эктопической конечности (показана стрелкой). **В.** Тип конечности у курицы определяют белки *Tbx4* и *Tbx5*. Гибридизация *in situ* показывает, что в ходе нормального развития у курицы *Tbx5* (синий) обнаруживается в передней части боковой пластинки мезодермы, а *Tbx4* (красный) — в задней. Почка конечности, содержащая *Tbx5*, развивается в крыло, тогда как *Tbx4*-содержащая почка развивается в лапу. Если новая конечность была образована под воздействием шарика, выделяющего FGF, то тип формирующейся конечности зависит от того, какой из генов *Tbx* экспрессировался в почке конечности. Будучи помещенным между областями экспрессии *Tbx4* и *Tbx5*, шарик с FGF будет индуцировать экспрессию *Tbx4* в задней части и *Tbx5* в передней. Образующаяся в результате почка конечности будет также экспрессировать *Tbx5* спереди и *Tbx4* сзади, что приведет к развитию химерной конечности. **Г.** Экспрессия *Tbx5* в почке передней конечности (к — крыло) и в передней части почки конечности, индуцированной шариком с FGF (красный конец стрелки). Окраска на мРНК *Mrf4*, маркирующая положение сомитов. **Д.** Экспрессия *Tbx4* в почке задней конечности (л — лапа) и в задней части почки конечности, индуцированной шариком с FGF (красный конец стрелки). **Е.** Химерная конечность (красная стрелка), индуцированная шариком с FGF. **Ж.** На поздних этапах развития химерная конечность содержит передние структуры крыла (перья) и задние структуры лапы (чешуйки). (Рис. В по данным: Н. Ohuchi and S. Noji, 1999. *Cell Tissue Res* 296: 45–56.)

ция *Islet1* и *Pitx1* осуществляется независимо, как и их роли в развитии задней конечности. Несмотря на то что для обоих генов показана положительная регуляция в отношении *Fgf10* и *Tbx4*, *Islet1* работает как индуктор закладки почки задней конечности (рис. 19.8В; *черные стрелки*), тогда как *Pitx1* играет роль в разметке задней конечности (рис. 19.8В; *серые стрелки*).

СТАДИЯ 3. ИНДУКЦИЯ ЭПИТЕЛИО-МЕЗЕНХИМНЫХ ПЕРЕХОДОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ TBX5

Перед формированием почки конечности соматоплевра боковой пластинки мезодермы имеет признаки псевдостратифицированного эпителия с апикально-базальной полярностью (рис. 19.10). Такая архитектура ткани вызывает недоумение, ведь эти клетки входят в состав зоны прогресса почки конечности, которая состоит из мезенхимных клеток. Исследования показали, что эпителиальные клетки, формирующие мезодерму ранней соматоплевры, подвергаются эпителио-мезенхимному переходу (ЕМТ) именно в поле конечности, прежде чем какие-либо признаки такого поведения клеток будут заметны в мезодерме фланкирующих областей (Gros and Tabin, 2014). Прослеживание путей клеток мезодермы соматоплевры выявило видимые изменения морфологии от эпителиальной к мезенхимной в течение 24 ч. По крайней мере в случае передней конечности мыши, нокаутированные по *Tbx5*, показывали значительную утрату мезенхимы почки конечности, что подтверждает участие *Tbx5* в качестве главного регулятора ЕМТ в поле передней конечности (см. рис. 19.8Б; *зеленые стрелки*). Неизвестно, в какой степени необходимы для ЭМП в задней конечности *Islet1*, *Fgf10* и другие факторы (*Tbx4*, *Pitx1*).

СТАДИЯ 4. СТАНОВЛЕНИЕ ДВУХ ПЕТЕЛЬ ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ПОЧКИ КОНЕЧНОСТИ ПОД ВЛИЯНИЕМ FGF-WNT

Благодаря повышению экспрессии *Tbx5* в передней конечности и экспрессии *Islet1* в задней мезенхимные клетки становятся коммитированными к развитию почки конечности и секретируют паракринный фактор *Fgf10*. Белок *Fgf10* служит сигналом к запуску и распространению взаимодействий эктодермы и мезодермы, обеспечивающих формирование конечности, и эти сигнальные взаимодействия напрямую способствуют формированию и росту почки конечности.

Формирование конечности, возможно, одно из самых примечательных морфологических событий в эмбриональном развитии. Этот процесс длительный, и *Fgf10* обладает морфогенетической способностью его индуцировать. Напомним, что шарик, выделяющий *Fgf10*, помещенный под фланкирующую эктодерму в месте, нехарактерном для закладки конечности, может индуцировать формирование дополнительной конечности (рис. 19.9Б, В; Ohuchi et al., 1997; Sekine et al., 1999). Рост почки конечности затем поддерживается *петлей положительной обратной связи*, таким образом *Wnt/β-катенин* и транскрипционные факторы поддерживают активность сигнального пути *Fgf10* (рис. 19.8Б, В; *черные пунктирные стрелки*). Белок *Fgf10* не просто поддерживает сигнальную петлю, способствующую развитию конечности, но и непосредственно индуцирует образование нового сигнального центра — апикального эктодермального гребня (АЭГ).

Секретируемое мезенхимой поле конечности *Fgf10* индуцирует лежащую над ним эктодерму к форми-

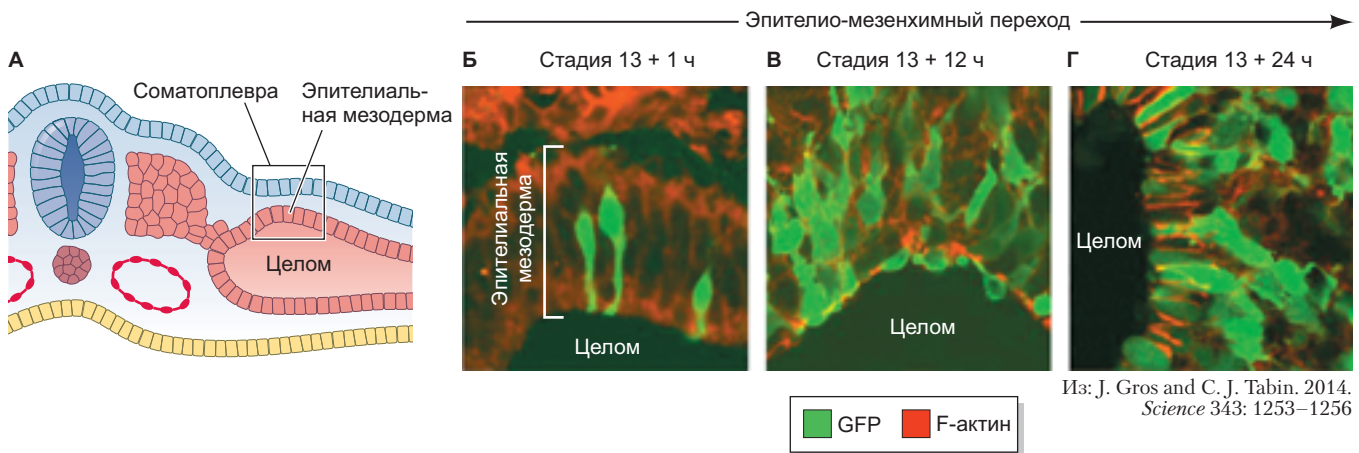


Рис. 19.10. Эпителио-мезенхимные переходы эпителиальной мезодермы соматоплевры в ходе формирования почки конечности. **А.** Мезодерма (боковая пластинка) соматоплевры эпителиальной природы. **Б–Г.** В течение 24-часового периода мезодерма (меченная с помощью GFP) подвергается эпителио-мезенхимному переходу в области поля конечности

рованию апикального эктодермального гребня (см. рис. 19.2Г; Xu et al., 1998; Yonei-Tamura et al., 1999). АЭГ лежит на дистальном крае почки конечности и станет главным сигнальным центром развивающейся конечности (Saunders, 1948; Kieny, 1960; Saunders and Reuss, 1974; Fernandez-Teran and Ros, 2008). Fgf10 способен индуцировать образование АЭГ в компетентной эктодерме между дорсальной и вентральной сторонами зародыша, граница между которыми необходима для формирования АЭГ (Carrington and Fallon, 1988; Laufer et al., 1997a; Rodriguez-Esteban et al., 1997; Tanaka et al., 1997).

Fgf10 стимулирует экспрессию Wnt3 (Wnt3a — у курицы; Wnt3 — у человека и мыши) в проспективной поверхностной эктодерме почки конечности. Белок Wnt активирует канонический β -катенин-зависимый каскад, чтобы индуцировать экспрессию Fgf8 в той же эктодерме (Fernandez-Teran and Ros, 2008). Из-за этого поверхностная эктодерма удлиняется и физически становится АЭГ.

Одна из основных функций АЭГ — сообщать мезенхимным клеткам, лежащим непосредственно под ним, чтобы они продолжали синтезировать Fgf10. Таким образом, вторая петля положительной обратной связи образуется, когда мезодермальный Fgf10 сообщает поверхностной эктодерме, чтобы она продолжала выделять Fgf8, а поверхностная эктодерма продолжает инструктировать подлежащую мезодерму к производству Fgf10 (см. рис. 19.8Б, В; *красные стрелки*; Mahmood et al., 1995; Crossley et al., 1996; Vogel et al., 1996; Ohuchi et al., 1997; Kawakami et al., 2001). Продолжающаяся экспрессия FGF поддерживает митозы в мезенхиме под АЭГ, что обеспечивает рост конечности.

Рост: формирование проксимально-дистальной оси конечности

Апикальный эктодермальный гребень

Апикальный эктодермальный гребень — многофункциональный сигнальный центр, который будет обеспечивать разметку развивающейся конечности по всем осям (рис. 19.11А, Б). Роль АЭГ заключается в: 1) поддержании мезенхимы, расположенной под ним, в пластичном, пролиферирующем состоянии, что способствует линейному (проксимально-дистальному, или от плеча к пальцам) росту конечности; 2) поддержании экспрессии молекул, задающих передне-заднюю (от большого пальца к мизинцу) ось; 3) взаимодействии с белками, отвечающими за спецификацию передне-задней и дорсально-вентральной (от тыльной стороны к ладони) осей таким образом, чтобы каждая клетка получала сигналы, как ей дифференцироваться (см. рис. 19.1).



Загадки развития

Автономная или неавтономная?

Антагонизм между ретиновой кислотой и Fgf8 — важный неавтономный механизм, необходимый для индукции развития передней конечности, но «битва» паракринных факторов не играет роли в индукции поля задней конечности. Достаточно ли предварительной разметки за счет экспрессии генов *Hox* и *Islet1* для поддержания автономного механизма индукции почки задней конечности? Более того, насколько важно четвертое измерение, т. е. время, в отношении развития задней конечности? Как бы вы экспериментально подошли к решению этих вопросов?

Проксимально-дистальный рост и дифференцировка почки конечности стали возможны благодаря серии взаимодействий АЭГ с мезенхимой почки конечности, расположенной непосредственно (в зоне 200 мкм) под ним. Как упоминалось ранее, эту мезенхиму называют мезенхимой зоны прогресса (ЗП), так как почка конечности удлиняется за счет ее пролиферации (Harrison, 1918; Saunders, 1948; Tabin and Wolpert, 2007). Эти взаимодействия были продемонстрированы в ряде следующих экспериментов на курином зародыше (рис. 19.11В):

- при удалении АЭГ в любой момент развития конечности прекращается дальнейшее развитие дистальных элементов скелета конечности;
- пересадка дополнительного АЭГ на существующую почку конечности приводит к формированию дополнительных структур, обычно на дистальном конце конечности;
- если мезенхиму ноги поместить непосредственно под АЭГ крыла, то на конце конечности разовьются дистальные структуры задней конечности (пальцы ноги); однако если мезенхима была трансплантирована дальше от АЭГ, то мезенхима задней конечности (ноги) встраивается в структуры крыла;
- если мезенхиму под АЭГ заменить на мезенхиму иного происхождения, АЭГ регрессирует и развития конечности не происходит.

Таким образом, хотя мезенхимные клетки индуцируют и поддерживают АЭГ, а также определяют, какой тип конечности сформируется, АЭГ все же отвечает за поддержание роста и развития конечности (Zwilling, 1955; Saunders et al., 1957; Saunders 1972; Krabbenhoft and Fallon, 1989). АЭГ поддерживает мезенхимные клетки, расположенные непосредственно под ним, в состоянии пролиферации и предотвращает их дифференцировку в хрящ (ten Berge et al., 2008).

Fgf8 является основным активным фактором в АЭГ, и шарики, выделяющие Fgf8, могут заменить его функции по части индукции роста конечности (рис. 19.11В, ряд 5). Есть и другие белки FGF, выделяемые АЭГ, такие как Fgf4, Fgf9 и Fgf17 (Lewan-

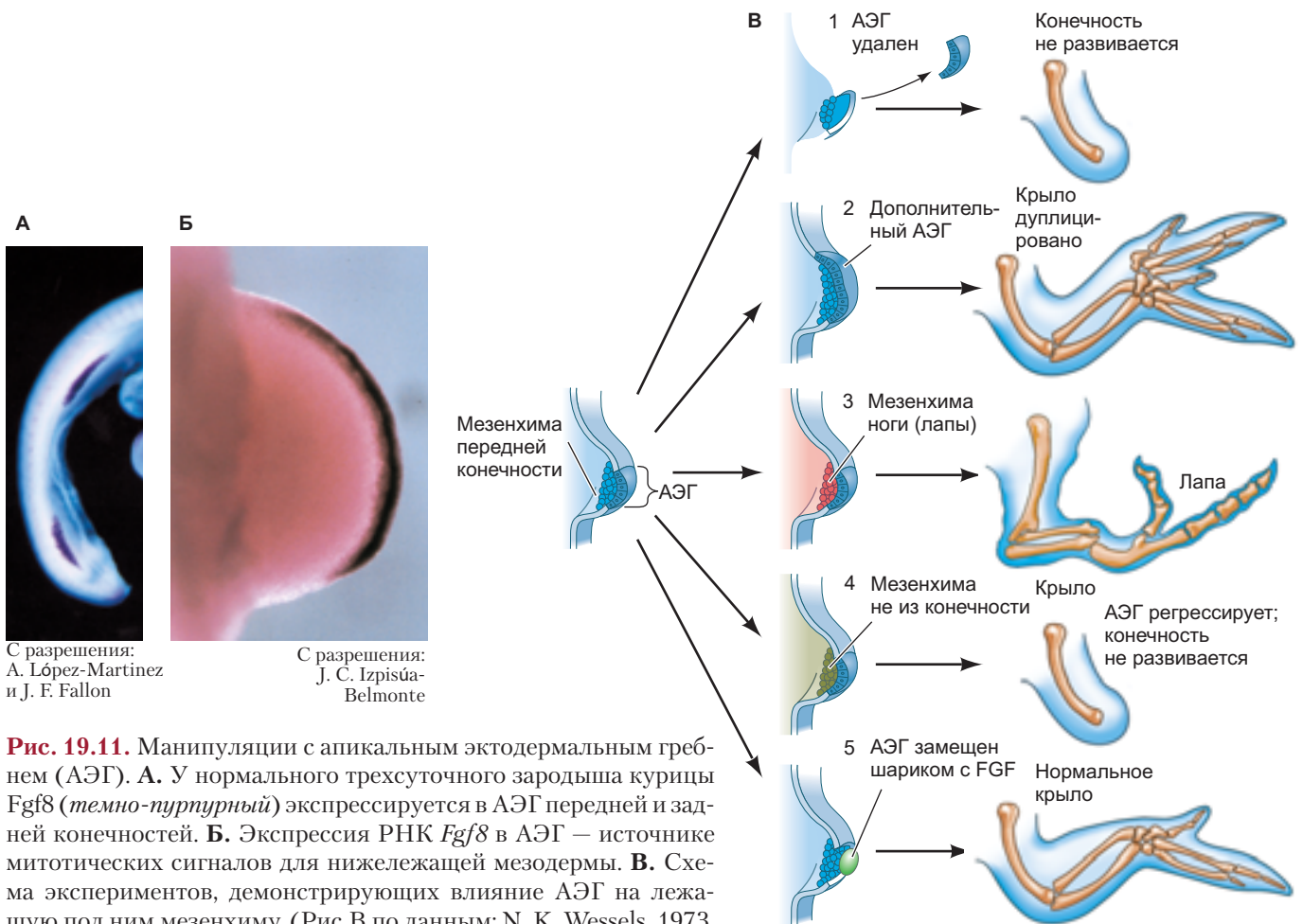


Рис. 19.11. Манипуляции с апикальным эктодермальным гребнем (АЭГ). **А.** У нормального трехсуточного зародыша курицы *Fgf8* (темно-пурпурный) экспрессируется в АЭГ передней и задней конечностей. **Б.** Экспрессия РНК *Fgf8* в АЭГ — источнике митотических сигналов для нижележащей мезодермы. **В.** Схема экспериментов, демонстрирующих влияние АЭГ на лежащую под ним мезенхиму. (Рис В по данным: N. K. Wessels, 1973. *Tissue Interaction in Development: An Addison-Wesley Module in Biology*, no 9. Addison-Wesley Longman: Boston.)

doski et al., 2000; Boulet et al., 2004). Утрата функции любого из них приводит лишь к небольшим дефектам развития скелета либо не приводит вовсе, вследствие чего можно предположить, что внутри этого семейства белков присутствует значительная избыточность для паттернирования конечности. Однако выключение нескольких генов FGF демонстрирует усиливающиеся и специфичные нарушения формирования скелета с каждым заблокированным геном FGF, что поддерживает идею о некотором контроле паттернирования со стороны молекул FGF, секретируемых АЭГ (см. рис. 19.8Б, В; красные стрелки; Mariani et al., 2008).

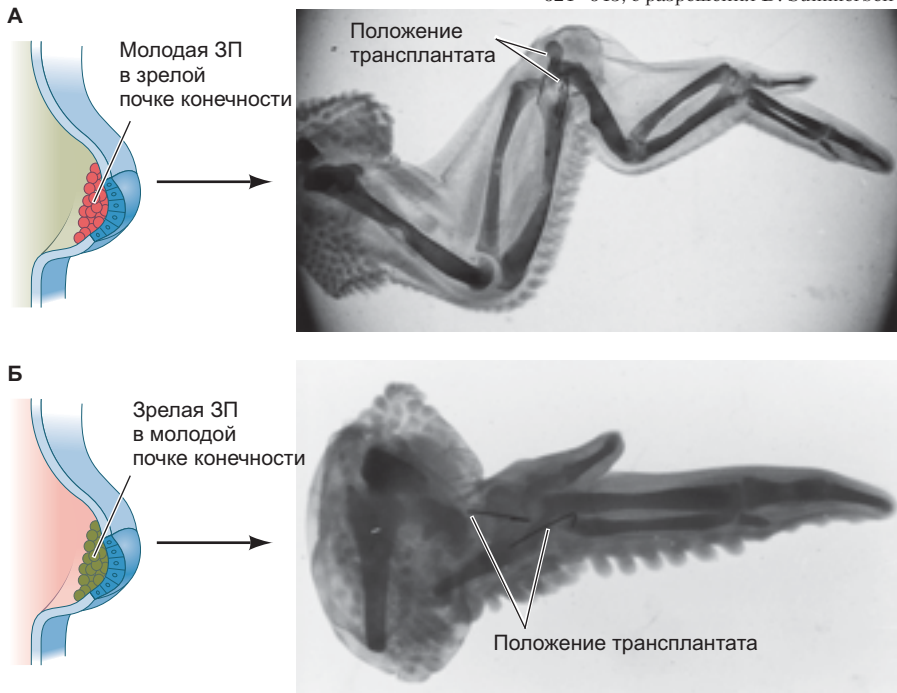
Спецификация мезодермы конечности: детерминация проксимально-дистальной полярности

РОЛЬ АЭГ

В 1948 г. Джон Сондерс сделал простое и основательное наблюдение: если удалить АЭГ на ранней стадии формирования почки конечности крыла, то форми-

руется только плечевая кость. Если АЭГ удалить немного позже, то формируются плечевая, лучевая и локтевая кости (Saunders, 1948; Iten, 1982; Rowe et al., 1982). Объяснить, как так получается, оказалось не просто. Сначала нужно было установить, находится ли позиционная информация о проксимально-дистальной оси в АЭГ или в мезенхиме зоны прогресса. С помощью серии реципрокных трансплантаций было обнаружено, что эта информация связана с мезенхимой. Если бы позиционную информацию предоставлял АЭГ (т. е. как-то инструктировал бы недифференцированные мезенхимные клетки под ней, какие структуры им образовывать), то более зрелый АЭГ в паре с более молодой мезодермой должны были образовать конечности с недостающими элементами в середине, а более молодой АЭГ с более зрелой мезенхимой — конечности с дублированными структурами. Не было показано, что такие случаи имели место; скорее наоборот, нормальные конечности формировались в обоих экспериментах (Rubin and Saunders, 1972). Однако, когда целую зону прогресса (и мезодерму, и АЭГ) от раннего зародыша помещали на почку конечности эмбриона более поздней стадии развития, новые проксимальные структуры

Из: D. Summerbell and J. H. Lewis.
1975. *J Embryol Exp Morphol* 33:
621–643, с разрешения D. Summerbell



С разрешения: D. Summerbell

Рис. 19.12. Контроль спецификации передне-задней оси конечности коррелирует с возрастом мезенхимы зоны прогресса (ЗП). **А.** Дополнительные локтевая и лучевая кости сформировались после пересадки зоны прогресса молодой почки крыла в зрелую почку крыла, уже сформировавшую свои локтевую и лучевую кости. **Б.** Утрата промежуточных структур при пересадке зоны прогресса зрелой почки крыла в его молодую почку

образовывались за уже имеющимися (рис. 19.12А). И наоборот, при подсаживании более зрелой зоны прогресса к более молодой почке конечности дистальные структуры развивались таким образом, что пальцы выглядели растущими из плечевой кости, без лежащих в норме между ними локтевой и лучевой костей (рис. 19.12Б; Summerbell and Lewis, 1975). Эти эксперименты, показавшие, что мезенхима определяет индивидуальность скелета по проксимально-дистальной оси, подводят нас к следующему вопросу: как?

ГРАДИЕНТНЫЕ МОДЕЛИ СТРУКТУРИРОВАНИЯ КОНЕЧНОСТИ

В 2010 г. доказательства разметки конечности у курицы привели к появлению модели двух противодействующих градиентов: 1) градиента белков FGF и Wnt из АЭГ и 2) градиента ретиноевой кислоты из проксимальной ткани, фланкирующей места закладки конечностей (рис. 19.13А). Такое объяснение с участием двух градиентов предлагалось ранее (Maden, 1985; Crawford and Stocum, 1988a, b; Mercader et al., 2000), но настоящие доказательства для этой модели появились только в 2011 г. из экспериментов по пересадке мезенхимы (Cooper et al., 2011; Roselló-Díez et al., 2011).

Исследователи взяли недифференцированную мезенхиму почки конечности и поместили ее в эктодермальную «скорлупу» другой молодой почки конечности. Ожидалось, что возраст мезенхимы определит тип формирующихся костей. Однако тип

формирующейся кости оказался более проксимальным (в направлении стилоподия) в случае, когда молодая мезенхима почки конечности была обработана РК в присутствии Wnt и FGF, она становилась более дистальной (в направлении аутоподия), чем мезенхима, обработанная только FGF и Wnt (рис. 19.13Б, В). Более того, при ингибировании активности FGF кости оказывались более проксимальными; при подавлении синтеза РК — кости становились более дистальными. Таким образом, был выявлен баланс между проксимализацией костей под действием РК из фланкирующей ткани и дистализацией костей из-за FGF и Wnt из АЭГ. Противодействующие градиенты могут дополнять этот баланс наложением сегментированного паттерна экспрессии различных транскрипционных факторов в мезенхиме. Такие противодействующие градиенты, возможно, представляют собой общий механизм спецификации клетки, как мы это уже видели на примере раннего развития *Drosophila* (см. гл. 9).

Модель Тьюринга: реакционно-диффузионный механизм проксимально-дистального развития конечности

Гены и белки не создают скелет. Его формируют клетки. Типы клеток в стилоподии и аутоподии идентичны; различно лишь их расположение в пространстве. Удивительно, но диссоциированная мезенхима

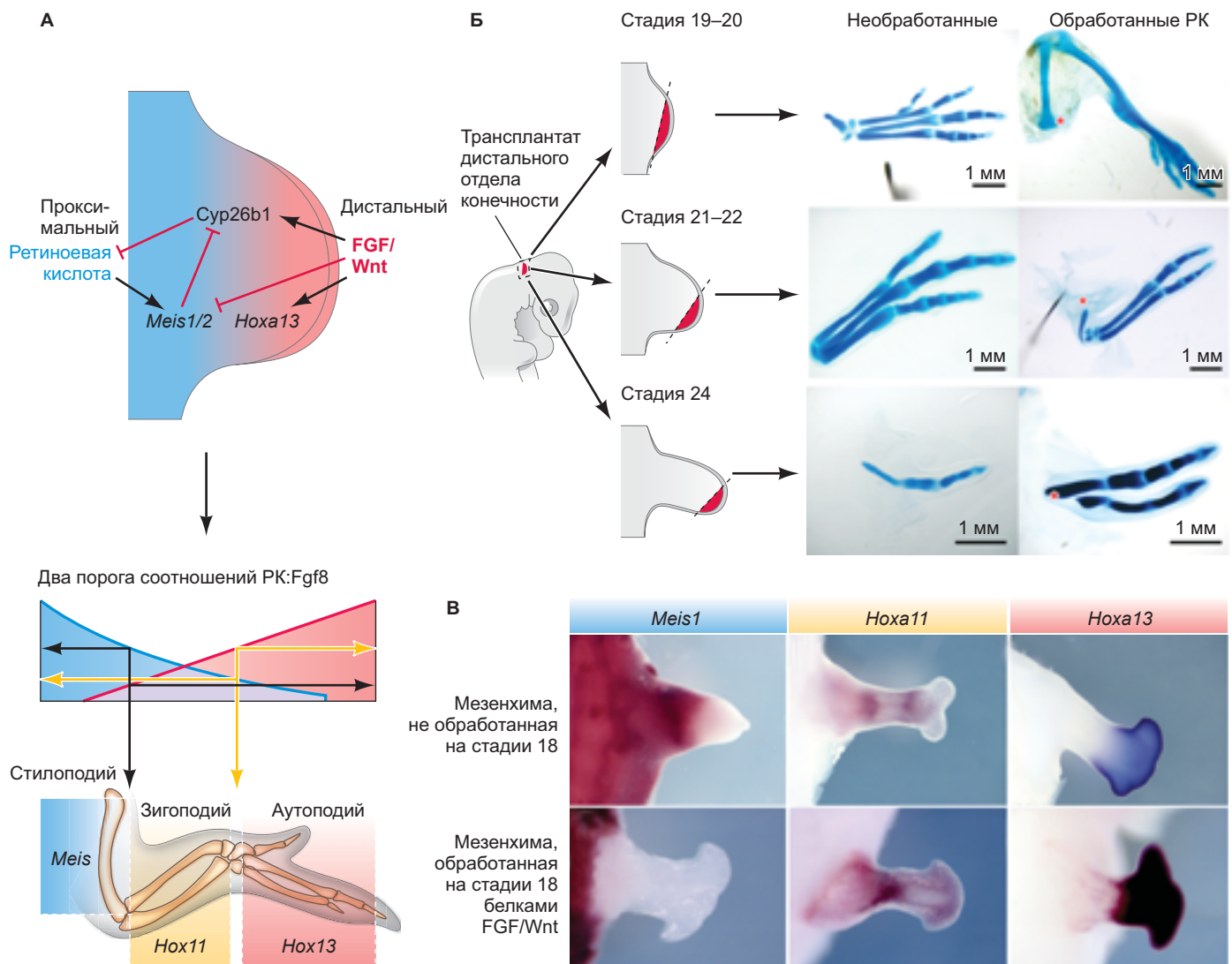


Рис. 19.13. **А.** Модель паттернирования конечности, в которой проксимально-дистальная ось образуется благодаря противодействующим градиентам РК (синий) из проксимальной фланкирующей ткани и белков FGF и Wnt (розовый) из дистального АЭГ. **Б.** Эксперимент по пересадке на зародыше курицы. Показана трансплантация верхушки почки конечности в головную область другого куриного зародыша. В верхушку почки конечности был в некоторых случаях подсажен шарик, смоченный РК (звездочкой отмечено положение шарика). Результаты показывают, что РК вызывает проксимализацию костей, формирующихся из пересаженной мезенхимы. Необработанная верхушка почки конечности (красная) давала специфичный хрящ конечности в зависимости от возраста. Однако после обработки верхушки почки конечности РК в концентрации 1 мг/мл формирующийся скелет становился более проксимальным. **В.** Обработка белками FGF и Wnt меняет паттерн экспрессии специфичных проксимально-дистальных транскрипционных факторов в пересаженной мезенхиме (темное окрашивание). *Meis1* специфичен для стилоподия, *Hoxa11* — для зигоподия, а *Hoxa13* — для аутоподия. Мезенхима самой ранней почки конечности (стадия 18) будет формировать все три типа хряща. Если же мезенхиму предварительно инкубировать в Fgf8 и Wnt3a, то транскрипционный фактор *Hoxa13*, характерный для аутоподия, экспрессируется значительно сильнее, тогда как экспрессия маркера стилоподия *Meis1* существенно подавлена. Добавление РК в культуру необходимо для поддержания компетенции, позволяющей экспрессировать *Meis1* проксимально (не показано). (Рис. А по данным: S. Mackem and M. Lewandoski, 2011. *Science* 332: 1038–1039; рис. Б по данным: Roselló-Diez et al., 2011. *Science* 332: 1086–1088; рис. В по данным: K. L. Cooper et al., 2011. *Science* 332: 1083–1086.)

конечности, помещенная в культуру, способна к самоорганизации, экспрессии 5'-Нох-генов и формированию структур, подобных конечности, с палочками и узелками хрящей (Ros et al., 1994), что порождает фундаментальный вопрос: как эти клетки «узнают» о правильной организации? Если говорить об эмбриональной конечности — почему только один хрящевой элемент формируется на стилоподии, тогда как на зигоподии формируется два, а на аутоподии — несколько? Каким образом градиенты, окружающие эти клетки, сообщают им о том, как создать разные части скелета в определенных местах? Почему пальцы всегда находятся на дистальном конце конечности? Ответы может дать модель, построенная на диффузии двух или более негативно взаимодействующих сигналов. Она известна как реакционно-диффузионный механизм разметки в развитии.

РЕАКЦИОННО-ДИФфуЗИОННАЯ МОДЕЛЬ

Реакционно-диффузионный механизм представляет собой математическую модель, сформулированную Аланом Тьюрингом (1952) для объяснения того, как сложные распределения химических соединений могут образоваться в системах, где изначально они были распространены равномерно. Тьюринг — британский математик и исследователь в области информатики, взломавший немецкий шифровальный код «Энигма» в ходе Второй мировой войны, (см. фильм 2014 г. *Игра в имитацию*). За два года до смерти он представил биологам основную математическую модель, объясняющую, как структуры могут самоорганизовываться. Несмотря на то что некоторые исследователи начали применять его модель в 1970-е гг. для хондрогенеза конечности (Newman and Frisch, 1979), широкое признание она получила лишь в последнее время, с накоплением экспериментальных подтверждений.

Уникальность модели Тьюринга заключается в «реакционной» составляющей ее механизма. Зависимость от молекулярных паттернов отсутствует; скорее взаимодействия между двумя молекулами могут случайным образом создать неоднородную структуру (с прикладной точки зрения рассмотрено у Kondo и Miura, 2010). Тьюринг понял, что возникновение таких структур не произошло бы в присутствии только одного диффундирующего морфогена, но что это *могло* быть результатом действия двух равномерно распределенных субстанций (которые мы будем называть морфогеном *A* как «активатор» и морфогеном *I* как «ингибитор») в случае, *если скорость образования каждой из субстанций зависит от другой* (рис. 19.14А, Б).

Модель Тьюринга составляет основу для системы «локальная аутоактивация — латеральное ингибирование» (ЛАЛИ), создающей устойчивые структуры, которые могут стимулировать изменения в разви-

тии (Meinhardt, 2008). (Другие реакционно-диффузионные системы, подобные системе Тьюринга, тоже могут использоваться клетками со схожими результатами.) В модели Тьюринга морфоген *A* способствует производству еще большего количества морфогена *A* (аутоактивация), а также продукции морфогена *I*. Морфоген *I*, однако, ингибирует продукцию морфогена *A* (латеральное ингибирование). Математический анализ Тьюринга показал, что если *I* диффундирует активнее, чем *A*, то образуются резкие колебания концентрации морфогена *A* (рис. 19.14В).

Диффузия взаимодействующих сигналов может изначально быть случайной, но затем из-за динамики концентраций активатора и ингибитора в ЛАЛИ-подобной модели Тьюринга образуются перемежающиеся области высоких и низких концентраций морфогена, что приводит к разным траекториям развития клеток. Когда активирующий морфоген присутствует в концентрации выше определенного порогового значения, клетка (или группа клеток) может быть проинструктирована к дифференцировке по определенному пути.

Модель Тьюринга дала прекрасные результаты в применении к развитию конечности (рис. 19.14Г, Д). Оказалось, что реакционно-диффузионная динамика может сообщить нам, как почка конечности приобретает проксимально-дистальную полярность, а также как число пальцев регулируется на дистальном конце конечности (о Тьюринге и пальцах расскажем далее в этой главе). Реакционно-диффузионная система была выдвинута как достаточная для формирования структур, предшествующих хрящевой и нехрящевой тканям (Zhu et al., 2010).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

С ТЬЮРИНГОМ — ВДОЛЬ КОНЕЧНОСТИ

В лаборатории Стюарта Ньюмена было показано, что реакционно-диффузионная модель может обеспечивать структурирование мезенхимы конечности и что размер и форма имеют значение в этом процессе (Hentschel et al., 2004; Chaturvedi et al., 2005; Newman and Bhat, 2007; Zhu et al., 2010; Zhang et al., 2013). Для математического моделирования хондрогенеза конечности на основе модели Тьюринга необходимо определить ключевые параметры. При хондрогенезе вдоль проксимально-дистальной оси АЭГ как бы разделяет конечность на два домена: *ингибиторный домен* (называемый также *апикальной зоной*) — наиболее дистальную мезенхиму, подлежащую АЭГ, в которой подавлена конденсация (скопление) прехондральной мезенхимы; и *активную зону*, лежащую проксимально по отношению к ингибиторному домену и представляющую собой морфогенетически

активный домен, в котором происходит конденсация прехондральной мезенхимы. Третий домен, «замороженная» зона, находящийся далеко за пределами влияния АЭГ, содержит сформированные хрящевые зачатки скелета в проксимальных отделах развивающейся конечности. Параметры Тьюринга применимы в пределах активной зоны мезенхимы конечности (рис. 19.15). Активная и «замороженная» зоны в дальнейшем определяются (и в ткани,

и по дифференциальным уравнениям математической модели) по собственной уникальной экспрессии FgfR2 и FgfR3 соответственно (Szebenyi et al., 1995; Hentschel et al., 2004).

Клетки мезенхимы конечности в активной зоне синтезируют *активаторы* формирования хрящевых узелков. Среди этих активаторов TGF β , BMP, активины и некоторые углеводсвязывающие белки, называемые галектинами. Галектины могут

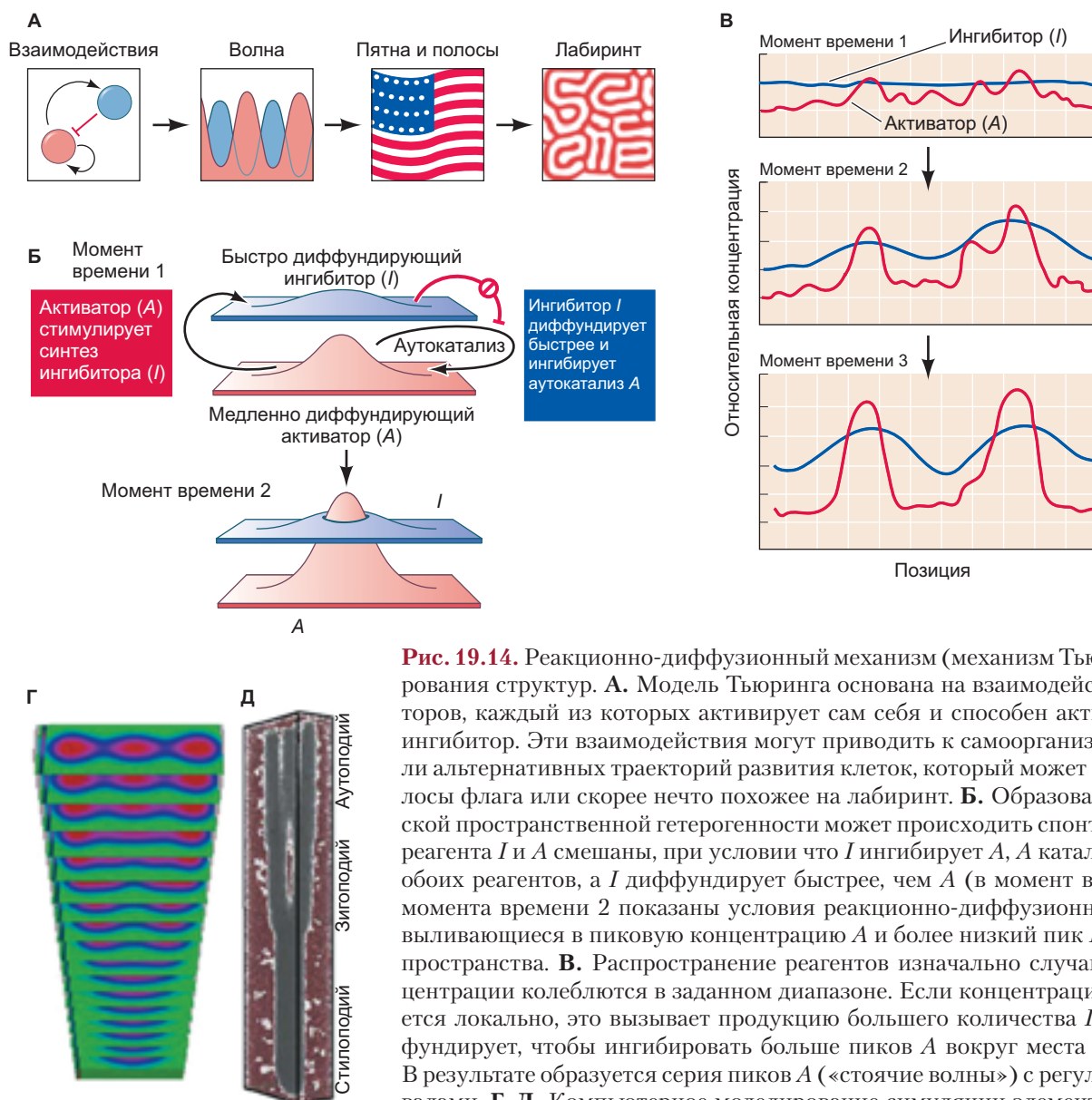


Рис. Г из: R. Chaturvedi et al., 2005. *J R Soc Interface* 2: 237–253

Рис. Д из: Y. T. Zhang et al., 2013. *Math Biosci* 243: 1–17, с изменениями из: T. M. Cickovski, 2005. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 2: 273–288

Рис. 19.14. Реакционно-диффузионный механизм (механизм Тьюринга) формирования структур. **А.** Модель Тьюринга основана на взаимодействии двух факторов, каждый из которых активирует сам себя и способен активировать свой ингибитор. Эти взаимодействия могут приводить к самоорганизующейся модели альтернативных траекторий развития клеток, который может напоминать полосы флага или скорее нечто похожее на лабиринт. **Б.** Образование периодической пространственной гетерогенности может происходить спонтанно, когда два реагента *I* и *A* смешаны, при условии что *I* ингибирует *A*, *A* катализирует синтез обоих реагентов, а *I* диффундирует быстрее, чем *A* (в момент времени 1). Для момента времени 2 показаны условия реакционно-диффузионного механизма, выливающиеся в пиковую концентрацию *A* и более низкий пик *I* в той же точке пространства. **В.** Распространение реагентов изначально случайное, и их концентрации колеблются в заданном диапазоне. Если концентрация *A* увеличивается локально, это вызывает продукцию большего количества *I*, который диффундирует, чтобы ингибировать больше пиков *A* вокруг места его продукции. В результате образуется серия пиков *A* («стоячие волны») с регулярными интервалами. **Г, Д.** Компьютерное моделирование симуляции элементов конечности, которые должны образовываться в соответствии с механизмом самогенерации Тьюринга. **Г.** Вид в разрезе на морфоген-активатор TGF β на серии стадий развития конечности курицы (ход времени показан снизу вверх). Концентрация TGF β показана цветом (низкая — зеленым; высокая — красным). **Д.** Трехмерный вид клеток, подвергающихся конденсации костей (серый), как предсказано с помощью компьютерной симуляции. Обратите внимание, что число «костей» в каждом отделе конечности коррелирует с числом пиков концентрации TGF β во время развития, как показано на рис. Г. (Рис. А, Б по данным: S. Kondo and T. Miura, 2010. *Science* 329: 1616–1620, с разрешения S. Miyazawa.)

индуцировать формирование определенных молекул клеточной адгезии и белков внеклеточного матрикса, таких как фибронектин, что приводит к агрегации клеток с формированием хрящевого скелета. Те же клетки, однако, синтезируют и *ингибиторы* агрегации, такие как Noggin и ингибиторные галектины. В результате сформировавшиеся хондрогенные агрегаты ингибируют формирование таких же агрегатов вокруг себя (см. рис. 19.15, *внизу*).

Число формирующихся прехондральных уплотнений зависит от размеров конечности. Сначала может установиться одно уплотнение (плечевая кость), затем два (локтевая и лучевая кости), затем еще несколько (запястья и пальцы). В соответствии с этой реакционно-диффузионной гипотезой агрегация прехондральной мезенхимы активно вовлекает клетки из окружающей области и латерально ингибирует формирование других точек конденсации. Поэтому, число конденсаций зависит от геометрии активной зоны и силы латерального ингибирования. Будучи сформированными, агрегаты мезенхимных клеток взаимодействуют друг с другом, чтобы не только привлечь больше клеток, но и экспрессировать транскрипционные факторы (Sox9) и внеклеточный матрикс (коллаген 2), характерные для хряща (Lorda-Diez et al., 2011).

В соответствии с моделью волны синтеза и ингибирования должны формировать естественную структуру конечности. Наложением таких

ограничений, как геометрия, диффузия и скорость синтеза и деградации активаторов и ингибиторов, Zhu с коллегами смогли смоделировать типы скелета, формирующегося при росте почки конечности. Сначала компьютерная модель соответствовала нормальному структурированию конечности (рис. 19.16А). Затем она предсказывала формирование aberrантного скелета в результате манипуляций (рис. 19.16Б) или мутаций (рис. 19.16В). Изменение геометрии системы может приводить к формированию структур, наблюдаемых на ископаемых конечностях (рис. 19.16Г).

Спецификация передне-задней оси

Спецификация передне-задней оси конечности является наиболее ранним ограничением потенций клеток почки конечности в сравнении с их плюрипотентным состоянием. У курицы эта ось определяется незадолго до того, как почка конечности становится определяемой.

Sonic hedgehog определяет зону поляризующей активности

Виктор Гамбургер в 1938 г. показал, что уже на стадии развития 16 пар сомитов проспективная мезодерма крыла крупного эмбриона, трансплантированная

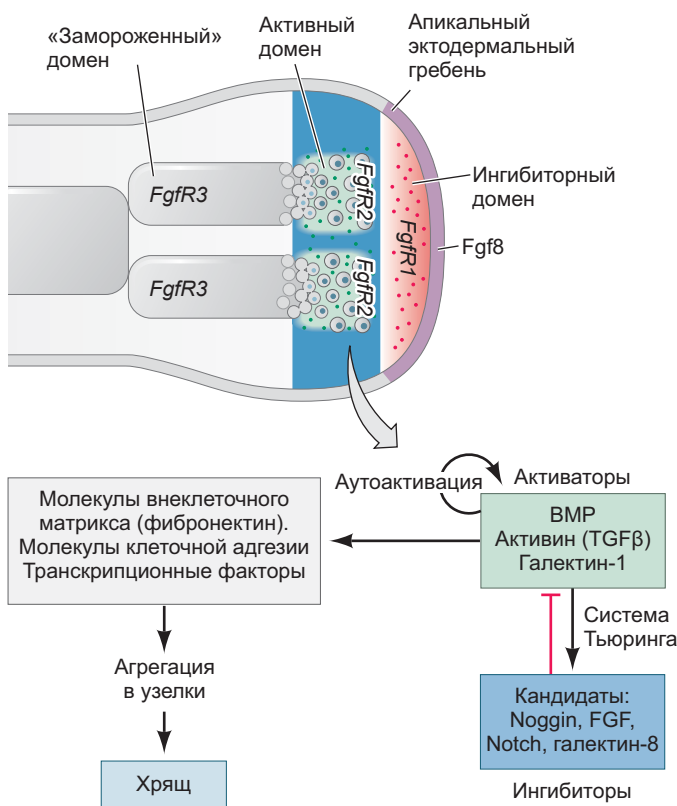


Рис. 19.15. Реакционно-диффузионный механизм проксимально-дистальной спецификации конечности. В ингибиторном домене, прилегающем к АЭГ, клетки поддерживаются в пролиферирующем состоянии белками FGF и Wnt, а формирование хряща для них запрещено. За этой областью в активном домене хрящевые узелки активно формируются в соответствии с реакционно-диффузионным механизмом. Здесь каждая клетка секретирует и может отвечать на активацию паракринными факторами суперсемейства TGFβ (TGFβ, BMP, активин) и факторами клеточной адгезии, такими как галектин-1. Факторы стимулируют свой синтез, а также синтез внеклеточного матрикса и белков клеточной адгезии, что способствует агрегации. Активация клеток тоже стимулирует синтез диффундирующих ингибиторов агрегации (в том числе Noggin и галектин-8), предотвращающих адгезию клеток в соседних областях. Области, где могут формироваться узелки, определяет геометрия почки конечности (т. е. от геометрии зависит, как много «волн» активатора может быть). В «замороженном» домене образовавшиеся узелки могут затем дифференцироваться в хрящ, таким образом «замораживая» конфигурацию. (По данным: J. Zhu et al., 2010. *PLOS ONE* 5: e10892.)

в боковую фланкирующую область, развивается в конечность с передне-задней и дорсально-вентральной полярностью донора, не реципиента. Ряд более поздних экспериментов (Saunders and Gasseling, 1968; Tickle et al., 1975) привел к предположению, что передне-заднюю ось определяет маленький блок мезодермальной ткани около задней границы молодой

почки конечности и стенки тела. Когда ткань из этой области пересаживали от молодой почки конечности в место на переднем крае другой почки, число пальцев в образующемся крыле было вдвое больше (рис. 19.17). Более того, структуры дополнительного набора пальцев оказались зеркальным отражением структур, образующихся в норме. Полярность сохра-

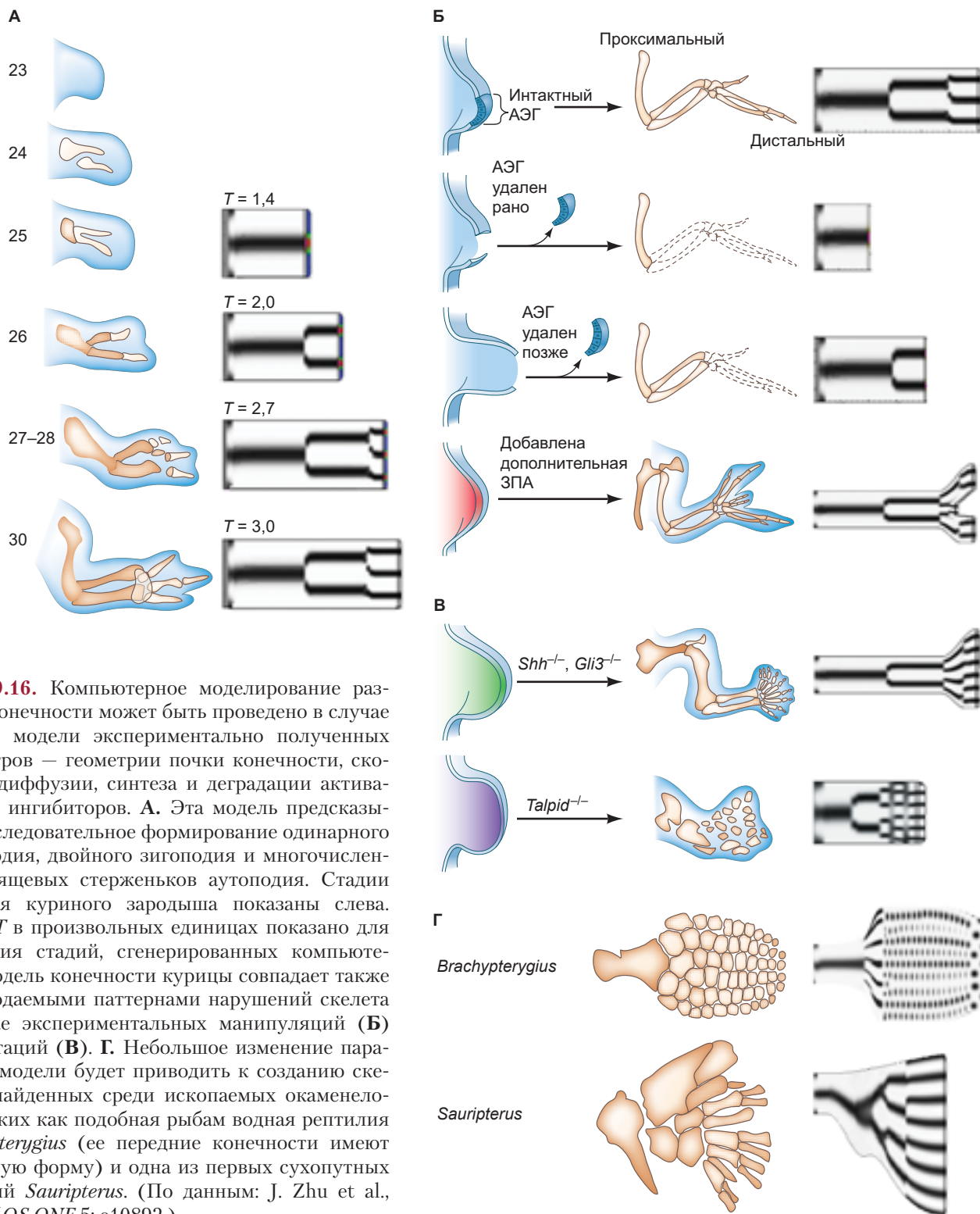
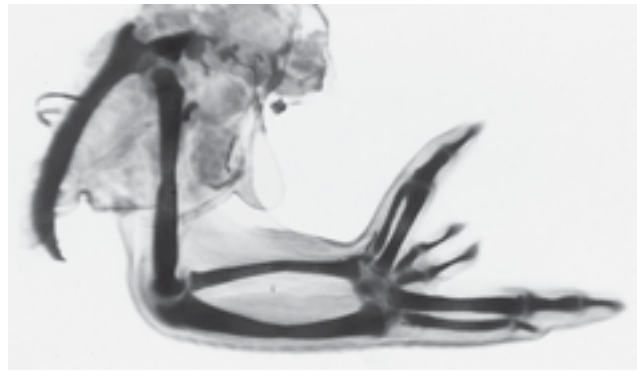
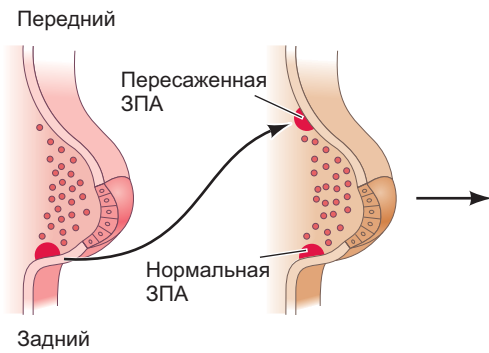


Рис. 19.16. Компьютерное моделирование развития конечности может быть проведено в случае учета в модели экспериментально полученных параметров — геометрии почки конечности, скоростей диффузии, синтеза и деградации активаторов и ингибиторов. **А.** Эта модель предсказывает последовательное формирование одинарного стилоподия, двойного зигоподия и многочисленных хрящевых стерженьков аутоподия. Стадии развития куриного зародыша показаны слева. Время T в произвольных единицах показано для сравнения стадий, сгенерированных компьютером. Модель конечности курицы совпадает также с наблюдаемыми паттернами нарушений скелета в случае экспериментальных манипуляций (**Б**) или мутаций (**В**). **Г.** Небольшое изменение параметров модели будет приводить к созданию скелетов, найденных среди ископаемых окаменелостей, таких как подобная рыбам водная рептилия *Brachypterygius* (ее передние конечности имеют лопастную форму) и одна из первых сухопутных рептилий *Sauripterus*. (По данным: J. Zhu et al., 2010. *PLOS ONE* 5: e10892.)



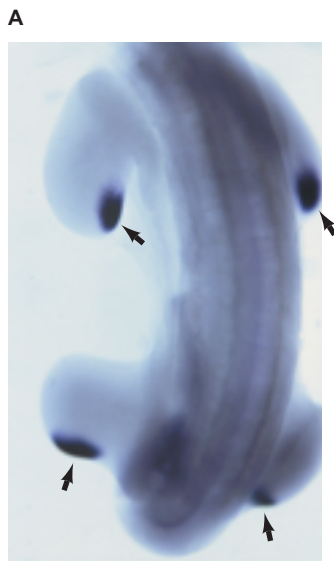
Из: L. S. Honig and D. Summerbell.
1985. *J. Embryol. Exp. Morphol.*
87: 163–174, с разрешения D. Summerbell

Рис. 19.17. Если ЗПА пересадить в переднюю мезодерму почки конечности, появятся дублированные пальцы, представляющие собой зеркальное отражение нормальных пальцев

нилась, но информация теперь поступала и с переднего, и с заднего концов оси. Данную область мезодермы назвали зоной поляризующей активности (ЗПА).

Поиск молекулы (или молекул), придающей поляризующую активность ЗПА, стал одной из наи-

более азартных игр в биологии развития. В 1993 г. Риддл с коллегами показали путем гибридизации *in situ*, что *Sonic hedgehog* (*Shh*), гомолог у позвоночных гена *hedgehog* мушки *Drosophila*, специфично экспрес-



С разрешения: R. D. Riddle

Б Зародыш на стадии 19–23

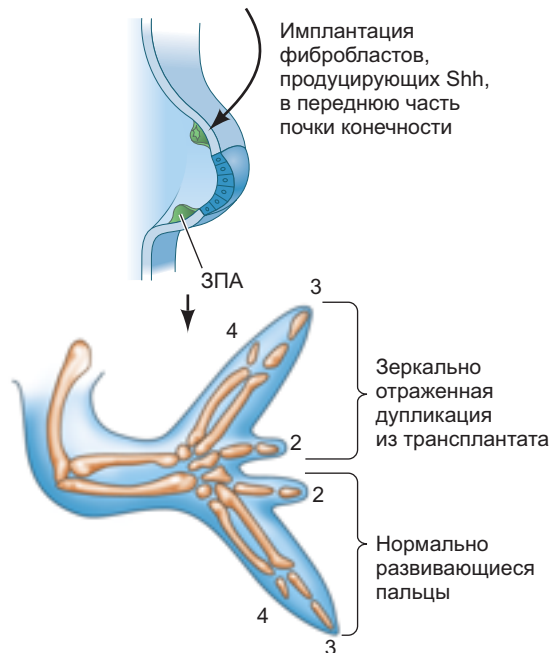


Рис. 19.18. Белок *Sonic hedgehog* экспрессируется в ЗПА. **А.** Гибридизация *in situ* показывает места экспрессии *Sonic hedgehog* (стрелки) в задней мезодерме почек конечностей курицы. Этот регион в точности совпадает с областью, которая с помощью экспериментов по трансплантации была определена как ЗПА. **Б.** *Shh* достаточно для функционирования ЗПА. Когда *Shh* эктопически продуцировали на переднем крае почки конечности у куриного зародыша (путем подсадки клеток, экспрессирующих рекомбинантный *Shh*), на образующейся конечности пальцы были дублированы зеркально отраженным образом. (Рис. Б по данным: R. D. Riddle et al., 1993. *Cell* 75: 1401–1416; J. W. Saunders and M. Gasseling, 1968. In *Epithelial-Mesenchymal Interactions: 18th Hahnemann Symposium*. Raul Fleischmajer, Rupert E. Billingham (Eds.), pp. 78–97. Williams & Wilkins: Baltimore.)

как ЗПА (рис. 19.18А). Чтобы доказать, что связь между ЗПА и *Sonic hedgehog* больше, чем просто корреляция, Риддл и коллеги (1993) показали, что секретиции белка Shh достаточно для поляризующей активности. Они трансфецировали эмбриональные фибробласты куриного зародыша (которые в норме никогда не синтезируют Shh) вирусным вектором, содержащим ген *Shh* (рис. 19.18Б). Ген стал экспрессироваться, транслироваться и секретироваться в фибробластах, которые затем поместили под переднюю эктодерму ранней почки конечности курицы. В результате образовался двойной набор зеркально отраженных пальцев, подобный набору, возникающему при пересадке ЗПА. Более того, экспериментально было показано, что шарик с белком *Sonic hedgehog* приводит к таким же дубликам (López-Martínez et al., 1995; Yang et al., 1997). Таким образом, *Sonic hedgehog* оказался активным агентом ЗПА.

Спецификация идентичности пальцев под влиянием *Sonic hedgehog*

Каким образом *Sonic hedgehog* определяет идентичность пальцев? Когда исследователи научились прецизионно проследивать в эксперименте траек-

? Загадки развития

Математическое моделирование может поставить перед биологами развития новые задачи и эксперименты, как модель Тьюринга сделала это с описанием формирования структур в органогенезе. Например, какие факторы в активной зоне являются главными «реактивными» активаторами и ингибиторами? Несмотря на то что TGF β наиболее вероятный кандидат на роль хондрогенного активатора, существует мало экспериментальных данных о потенциальных ингибиторах, предсказываемых моделированием. Роль клеточных движений тоже еще предстоит оценить.

торию развития клеток ЗПА, секретирующих Shh, они с удивлением обнаружили, что клетки, экспрессировавшие Shh в любое время, не подвергаются апоптозу (программированной клеточной гибели; см. гл. 15) наподобие того, как это делает АЭГ, закончив свою работу. Наоборот, потомки Shh-секретирующих клеток становятся костями и мышцами задней части конечности (Ahn and Joyner, 2004; Harfe et al., 2004). В самом деле, пальцы 5 и 4 (и часть пальца 3) задней конечности мыши развиваются из потомков клеток, секретирующих Shh (рис. 19.19).

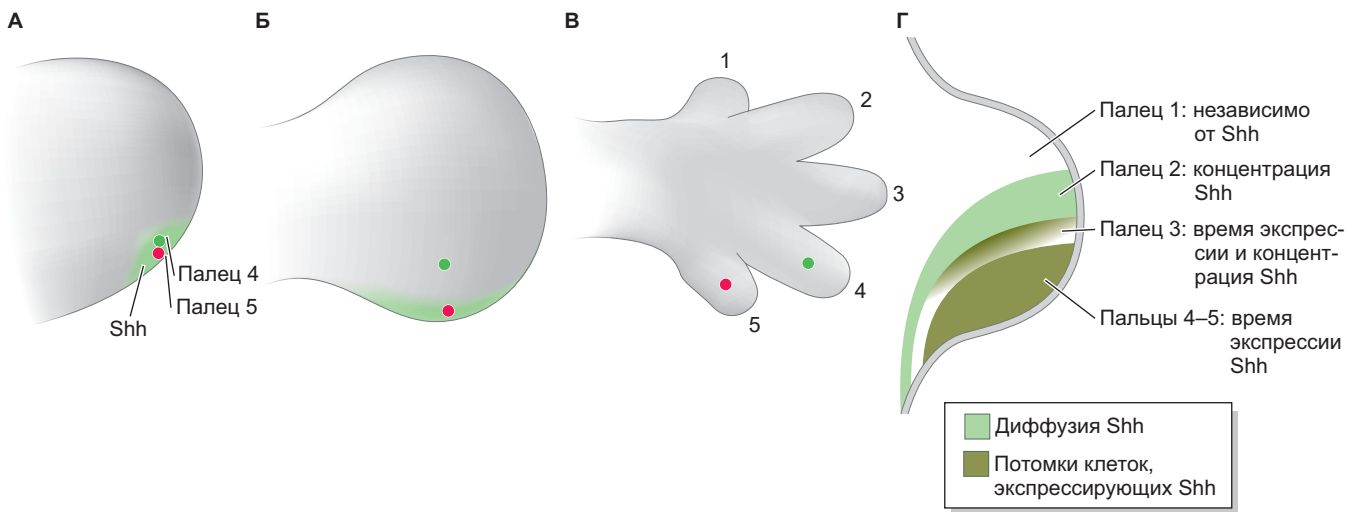


Рис. 19.19. Потомки клеток, секретирующих Shh, формируют четвертый и пятый пальцы, а также вносят вклад в спецификацию второго и третьего пальцев в конечности мыши. **А.** В ранней почке задней конечности мыши предшественники четвертого пальца (зеленая точка) и предшественники пятого пальца (красная точка) находятся в ЗПА и экспрессируют *Sonic hedgehog* (светло-зеленый). **Б.** На более поздних стадиях развития конечности клетки, формирующие пятый палец, по-прежнему экспрессируют Shh в ЗПА, тогда как клетки четвертого пальца уже нет. **В.** Когда формируются пальцы, клетки в пятом пальце будут демонстрировать высокий уровень белка Shh дольше, чем клетки четвертого пальца. **Г.** Схема, согласно которой четвертый и пятый пальцы специфицируются в соответствии с продолжительностью экспозиции их клеток к Shh по аутокринному типу; третий палец специфицируется в зависимости от продолжительности воздействия Shh на его клетки аутокринным и паракринным образом. Судьба второго пальца определяется под влиянием концентрации Shh, получаемой путем паракринной диффузии, а первый палец специфицируется независимо от Shh. (По данным: B. D. Harfe et al., 2004. *Cell* 118: 517–528.)

Похоже, что спецификация пальцев в первую очередь зависит от того, как долго экспрессировался ген *Shh*, и лишь в небольшой степени от того, какую концентрацию белка *Shh* получили другие клетки (Tabin and McMahon, 2008). Различия между четвертым и пятым пальцами заключаются в том, что клетки более заднего пятого пальца экспрессируют *Shh* дольше и находятся в контакте с *Shh* (по аутокринной схеме) в течение большего времени. Третий палец отчасти состоит из клеток, секретирующих *Shh* более короткое время, чем четвертый палец, и они также зависят от *Shh*, диффундирующего из ЗПА (это подтверждено тем, что четвертый палец не развивается, если *Shh* модифицировать так, что он утрачивает способность диффундировать от клеток). Спецификация второго пальца полностью зависит от диффузии *Shh*, а первый палец специфицируется независимо от *Shh*. Действительно, у встречающихся в природе мутантов, лишенных экспрессии *Shh* в конечности, развивается единственный палец — первый. Кроме того, когда гены *Shh* и *Gli3* находились в состоянии условного нокаута в конечности у мыши, образовавшиеся конечности имели множество пальцев, но пальцы были лишены видимых различий (Litingtung et al., 2002; Ros et al., 2003; Scherz et al., 2007). Появилось предположение, что первый палец специфицируется за счет *Hoxd13* в отсутствие *Hoxd12* (Vargas and Fallon, 2005). Эктопическая экспрессия *Hoxd12* в зачатке пальца приводила к трансформации первого пальца в более задний (Knezevic et al., 1997).

С помощью условного нокаута гена *Shh* у мыши (когда исследователи могут останавливать экспрессию *Shh* в разное время в ходе развития мыши), обнаружено, что *Sonic hedgehog* работает двумя разными путями в зависимости от времени (Zhu and Maskem, 2011). Первая фаза включает спецификацию идентичности пальцев (от заднего к переднему). В этой фазе *Shh* работает как морфоген, т. е. в первую очередь идентичность пальцев будет обусловлена концентрацией *Shh* в этой области почки конечности, а затем продолжительностью экспозиции *Shh*. Во второй фазе *Shh* действует как митоген — стимулирует пролиферацию и рост мезенхимы почки конечности, таким образом помогая придать форму почке конечности.

Sonic hedgehog и FGF: еще одна петля положительной обратной связи

Пока почка конечности относительно мала, устанавливается обеспечивающая рост конечности петля положительной обратной связи между Fgf10, вырабатываемым мезодермой, и Fgf8 из эктодермы (рис. 19.20А). По мере роста конечности появляется ЗПА и создается другая регуляторная петля (рис. 19.20Б). BMP в мезодерме подавляли бы FGF

в AER, если бы не *Shh*-зависимая экспрессия белка Gremlin, ингибитора BMP (Niswander et al., 1994; Zúñiga et al., 1999; Scherz et al., 2004; Vokes et al., 2008). *Sonic hedgehog* в ЗПА активирует Gremlin, ингибирующий BMP, что поддерживает экспрессию FGF и рост конечности. FGF, в свою очередь, ингибирует репрессоры белка *Shh*, что замыкает петлю положительной обратной связи. Впрочем, как и во многих мультигенных путях, эти взаимоотношения гораздо сложнее, чем описано здесь.

В зависимости от уровней FGF в апикальном эктодермальном гребне ЗПА может активироваться или ингибироваться; были описаны две петли обратной связи (рис. 19.20В; Verheyden and Sun 2008; Bénazet et al., 2009). Сначала относительно низкие концентрации FGF из АЭГ активируют *Shh* и поддерживают функционирование ЗПА. Сигналы FGF, как оказалось, ингибируют белки *Etv4* и *Etv5*, которые репрессируют транскрипцию *Sonic hedgehog* (Mao et al., 2009; Zhang et al., 2009). Таким образом, АЭГ и ЗПА взаимно поддерживают друг друга через положительную петлю *Sonic hedgehog* и FGF (Todt and Fallon, 1987; Laufer et al., 1994; Niswander et al., 1994). В передней области почки конечности Fgf8 положительно регулирует *Etv4/5*, который в свою очередь репрессирует *Shh* здесь же; это поддерживает передне-задний градиент *Shh* из зоны поляризующей активности (Mao et al., 2009).

В результате стимуляции *Shh* через сигнальный путь FGF повышается уровень Gremlin (мощного антагониста BMP) и положительная петля FGF/*Shh* поддерживает рост конечности (рис. 19.20Г). До тех пор пока Gremlin может диффундировать к АЭГ, белки FGF будут синтезироваться, а свойства АЭГ поддерживаться. Но так как уровень FGF тоже постепенно поднимается, запускается петля отрицательной обратной связи, блокирующая экспрессию Gremlin в дистальной мезенхиме (рис. 19.20Д). Репрессия синтеза Gremlin, совпадающая с прогрессивным удлинением почки конечности, увеличивает дистанцию между источником белка Gremlin и сигнальными центрами (АЭГ и ЗПА) в наиболее дистальной мезенхиме. В это же время BMP запрещает синтез FGF, АЭГ перестает функционировать и ЗПА (без поддержки белками FGF) останавливает свою работу. Эмбриональная фаза развития конечности заканчивается (рис. 19.20Е).

Нох-гены как часть регуляторной сети, обеспечивающей спецификацию идентичности пальцев

Как уже упоминалось в данной главе, Нох-гены принципиально важны для определения судеб клеток на каждой из осей конечности, а их экспрессия, особенно кластера *Hoxd*, происходит в две фазы (Zakany

et al., 2004; Tarchini and Duboule, 2006; Abbasi, 2011). Первая фаза важна для спецификации стилоподия и зигоподия, как уже обсуждалось (рис. 19.21). Последующая фаза экспрессии *Hoxd* помогает специфицировать аутоподий. В эти процессы вовлечены

два основных «ранних» *цис*-регуляторных региона, состоящие из многочисленных энхансеров, работающих совместно над специфической активацией генов *Hoxd* во времени и пространстве; эти регуляторные регионы называют ELCR и POST.

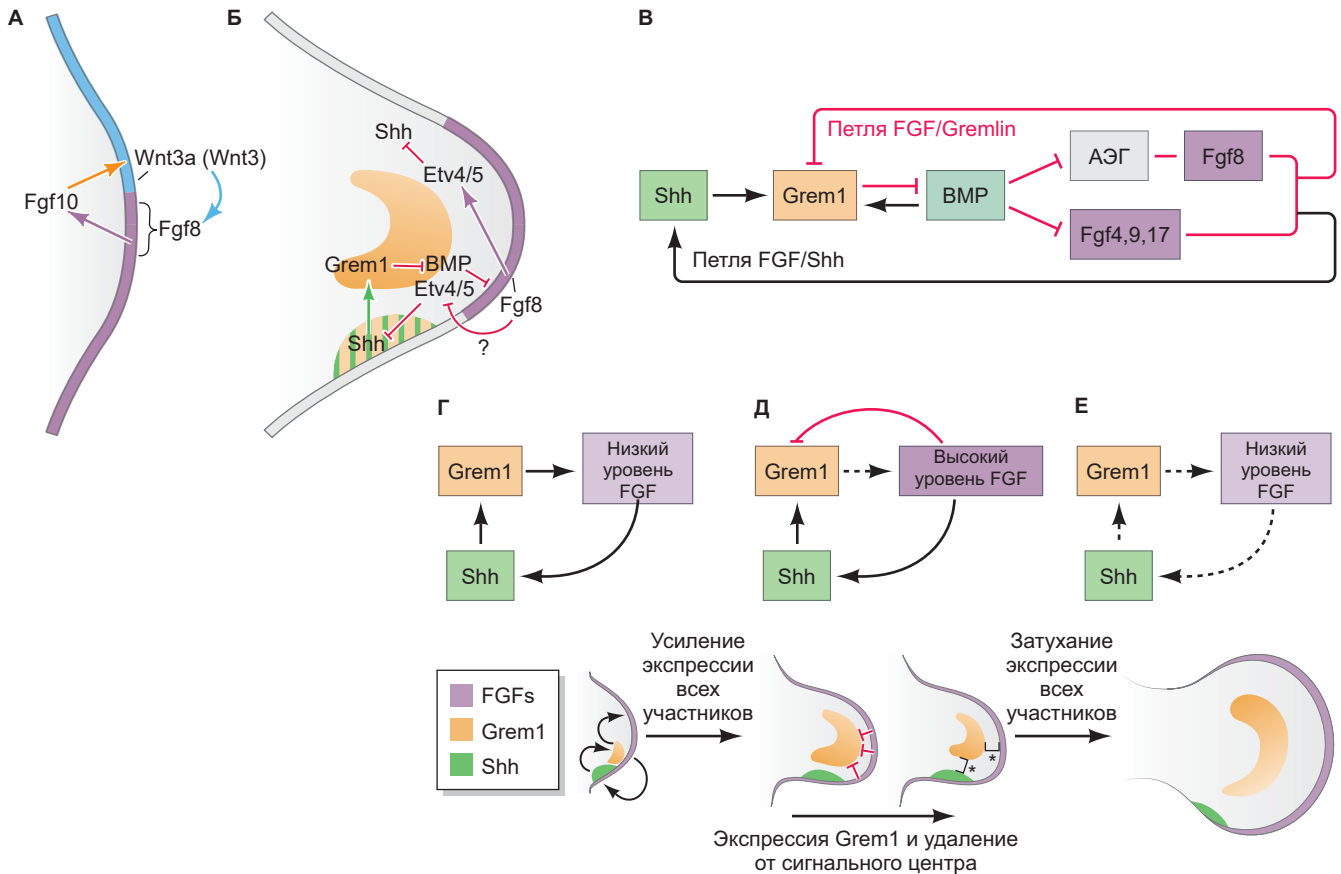


Рис. 19.20. Ранние взаимодействия АЭГ и мезенхимы почки конечности. **А.** В почке конечности Fgf10, секретируемый мезенхимой, происходящей из боковой пластинки мезодермы, активирует Wnt (Wnt3a — у курицы; Wnt3 — у мыши и человека) в эктодерме. Wnt активирует зависимый от β -катенина каскад, который запускает синтез Fgf8 в области близ АЭГ. Fgf8 активирует Fgf10, замыкая петлю положительной обратной связи. **Б.** По мере роста почки конечности Sonic hedgehog (Shh) создает новый сигнальный центр в задней мезенхиме, который определяет передне-заднюю полярность, а также активирует Gremlin (Grem1), чтобы не допустить блокирование синтеза FGF в АЭГ белком BMP мезенхимного происхождения. Более того, Fgf8 работает отчасти как дифференциальный регулятор *Etv4/5* (генов из суперсемейства транскрипционных факторов ETS) вдоль передне-задней оси почки конечности, которые, в свою очередь, поддерживают в задней части почки градиент экспрессии Shh. **В.** Две петли обратной связи в АЭГ и ЗПА. В петле положительной обратной связи (черная стрелка; внизу) белки FGF4, FGF9 и FGF17 из АЭГ активируют Shh, стабилизируя ЗПА. В ответной ингибиторной петле (красная; сверху) Shh из ЗПА активирует Gremlin (Grem1), блокирующий BMP, что предотвращает BMP-опосредованную инактивацию FGF в АЭГ. **Г.** Петли обратной связи обеспечивают взаимно поддерживаемый синтез Shh в ЗПА и FGF в АЭГ. **Д.** По мере продуцирования FGF его концентрация в конце концов достигает порога, когда он ингибирует Gremlin, таким образом разрешая BMP начать репрессию FGF в АЭГ. По мере увеличения числа клеток в области, где не происходит экспрессия Gremlin (скобки и звездочки), сигнал Gremlin около АЭГ становится все слабее и более не сдерживает BMP от репрессии FGF. **Е.** В этом месте АЭГ исчезает, убирая сигнал, стабилизирующий ЗПА, вследствие чего ЗПА также исчезает. (Рис. А, Б по данным: M. Fernandez-Teran and M. A. Ros, 2008. *Int J Dev Biol* 52: 857–871; рис. В по данным: J. M. Verheyden and X. Sun, 2008. *Nature* 454: 638–641.)

Главный ранний регуляторный регион (*early limb control regulatory*, ELCR) активирует транскрипцию в зависимости от времени: раньше активируется ген, который ближе расположен к ELCR. Второй ранний регуляторный регион POST (*posterior restriction*) накладывает пространственные ограничения на экспрессию 5'-*Hoxd*-генов (*Hoxd10-13*) таким образом, что гены, расположенные ближе всего к этому региону, имеют наиболее ограниченные домены экспрессии, начинающиеся с задней границы почки конечности (рис. 19.21А, Б).

В этой ситуации формируется структура вложенных доменов экспрессии белков *Hoxd*, не-

обходимых для активации дальнедействующего энхансера (ZRS-энхансера) гена *Sonic hedgehog*, активирующего, в свою очередь, экспрессию *Shh* в задней мезодерме почки конечности и формирование ЗПА (Tarchini et al., 2006; Galli et al., 2010). ЗПА находится также под влиянием *Hoxb8* во фланкирующей мезенхиме, которая, как оказалось, помогает установить заднюю границу почки передней конечности (рис. 19.21Б). Если *Hoxb8* эктопически экспрессируется в передней части почки передней конечности мыши, то ЗПА может также формироваться здесь (Charite et al., 1994; Hornstein et al., 2005).

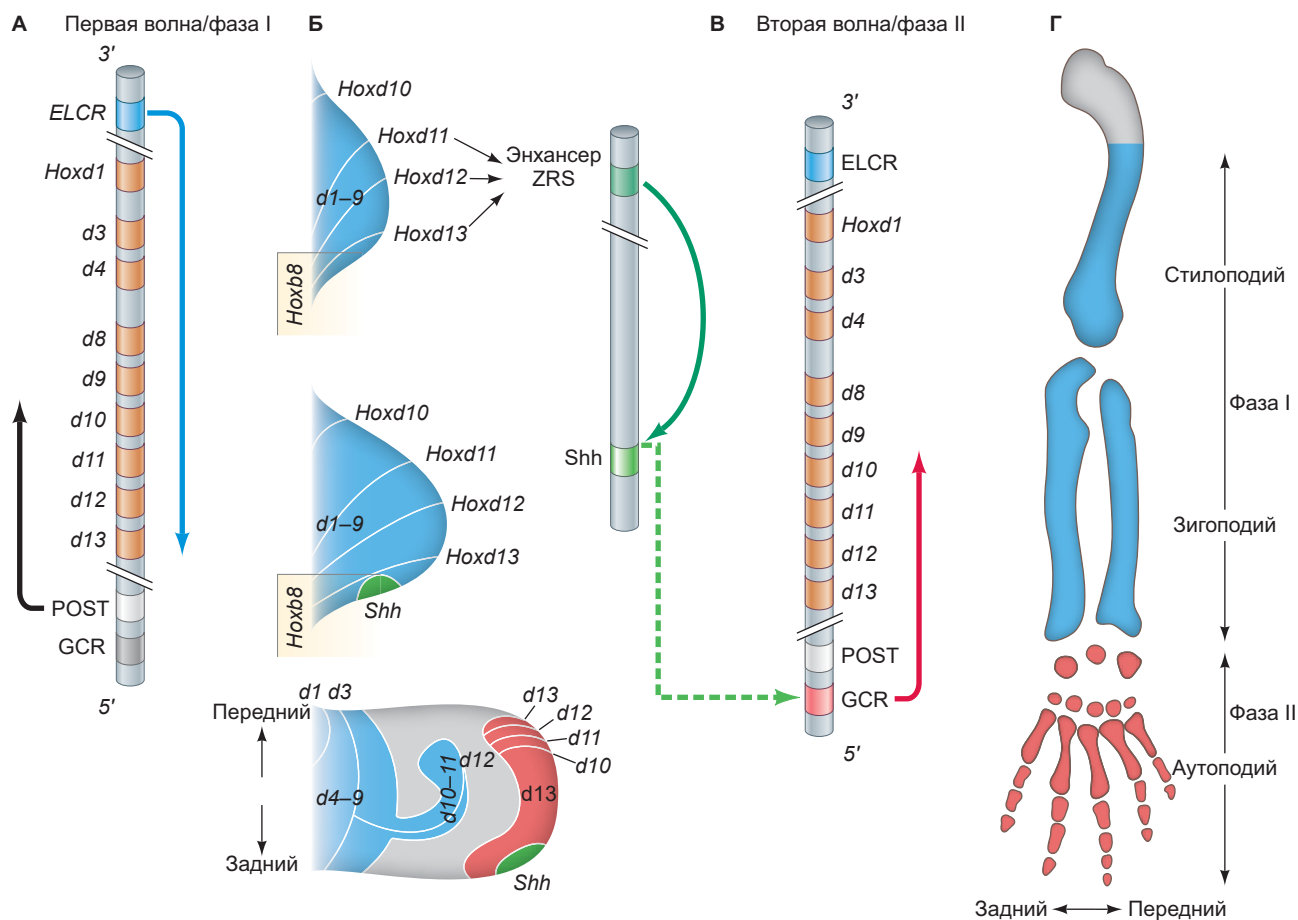


Рис. 19.21. Изменения в экспрессии гена *Hoxd* регулируют структуру конечности тетрапод в две независимые фазы. **А.** Первая фаза экспрессии *Hoxd* начинается с формирования почки конечности. Главный ранний регуляторный регион (ELCR) активирует эти гены вблизи себя раньше, чем гены, расположенные дальше, тогда как регуляторный элемент POST действует негативно, чтобы ограничить переднюю экспрессию этих генов в противоположном направлении. **Б.** Происходит формирование экспрессионных доменов, так что экспрессия *Hoxd13* ограничивается до наиболее задней области, а экспрессии *Hoxd12* позволено распространиться вперед. Расположенные в 5'-области *Hoxd*-гены активируют дальнедействующий энхансер гена *Shh* (ZRS), таким образом создавая ЗПА в задней части мезодермы конечности. Белые линии в почке конечности показывают границы областей экспрессии генов. **В.** Во второй фазе *Shh* активирует регуляторный локус GCR, который инвертирует паттерн экспрессии *Hoxd* таким образом, что *Hoxd13* оказывается впереди по отношению к остальным генам *Hoxd* (Б, красный внизу). **Г.** Скелетные элементы, специфицируемые в раннюю (синий) и позднюю (красный) фазы. (По данным: A. A. Abbasi, 2011. *Dev Dyn* 240: 1005–1016.)

Вступая в систему обратной связи, ЗПА может изменить паттерны экспрессии генов *Hoxd*. Sonic hedgehog, экспрессированный на заднем крае почки конечности, активирует второй набор энхансеров, называемый регионом глобального контроля, или GCR (рис. 19.21В, Г; Spitz et al., 2003; Montavon et al., 2011). Нох-гены, расположенные ближе к GCR, экспрессируются более широко. Эта экспрессия инвертирует нормальный паттерн экспрессии *Hoxd10–13*, так что *Hoxd13* экспрессируется на наиболее высоком уровне и доходит до переднего края почки конечности. *Hoxd12*, *Hoxd11* и *Hoxd10* экспрессируются немного более узкими доменами, так что самый передний палец (большой) экспрессирует *Hoxd13*, но не остальные Нох-гены (рис. 19.21Б, последняя схема; Montavon et al., 2008). Таким образом, первая фаза экспрессии генов *Hoxd* помогает специфицировать ЗПА, тогда как во вторую фазу экспрессии Нохд зона поляризующей активности определяет экспрессионные паттерны, и эти паттерны обеспечивают идентичность пальцев. В пользу данной модели говорят экспериментальные данные: трансплантация ЗПА или других клеток, секретирующих Shh, на передний край почки конечности на этой стадии приводит к формированию зеркальных паттернов

экспрессии *Hoxd* и, как следствие, зеркально отраженных пальцев (Izpisua-Belmonte et al., 1991; Nohno et al., 1991; Riddle et al., 1993).

Формирование дорсально-вентральной оси

Третья ось конечности отличает дорсальную половину конечности (кошачьи пальцы, ногти/когти) от вентральной (подушечки пальцев, подошвы стоп). В 1974 г. МакКейб и коллеги продемонстрировали, что дорсально-вентральную полярность почки конечности определяет эктодерма, обрамляющая ее. Если эктодерму повернуть на 180° относительно мезенхимы почки конечности, дорсально-вентральная ось окажется частично инвертирована таким образом, что дистальные элементы (пальцы) будут перевернуты «вверх ногами», что подтвердило позднюю спецификацию дорсально-вентральной оси конечности, регулируемую эктодермальным компонентом (или компонентами).

Особенно важным для спецификации дорсально-вентральной полярности оказался *Wnt7a*. Ген *Wnt7a* экспрессируется в дорсальной (но не в вен-

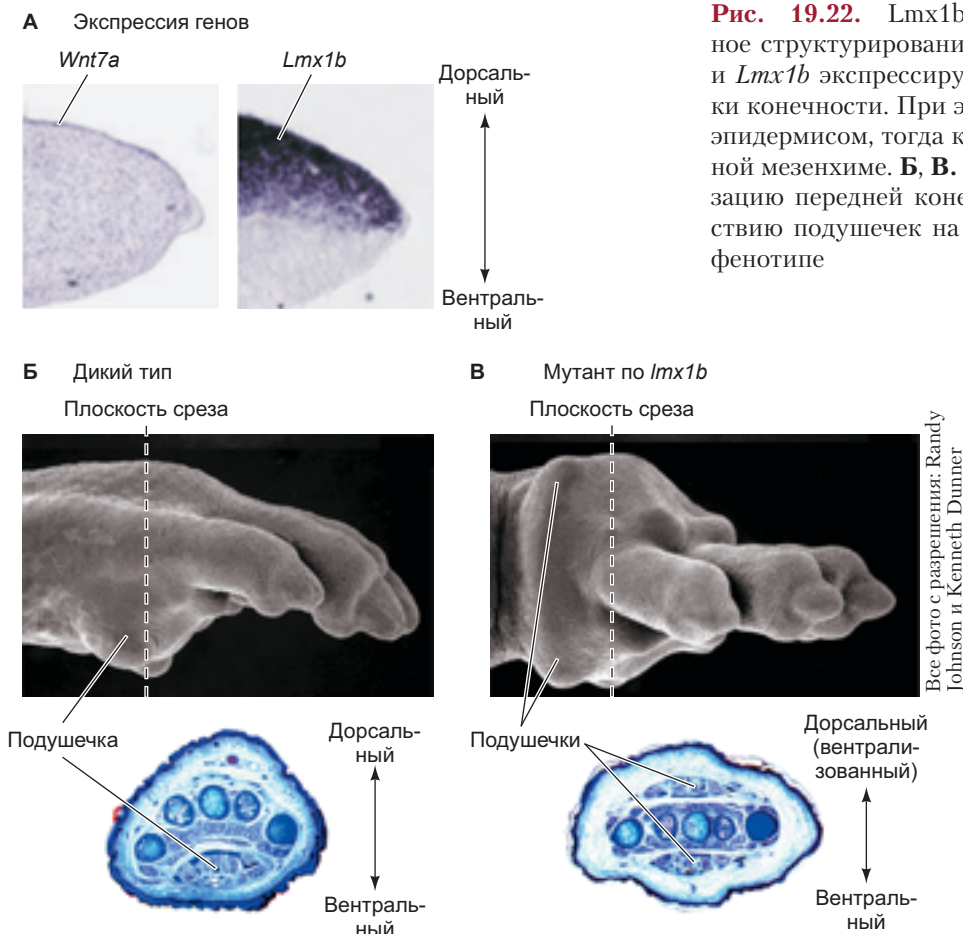


Рис. 19.22. *Lmx1b*-зависимое дорсально-вентральное структурирование под влиянием *Wnt7a*. **А.** *Wnt7a* и *Lmx1b* экспрессируются на дорсальной стороне почки конечности. При этом экспрессия *Wnt7a* ограничена эпидермисом, тогда как *Lmx1b* присутствует в дорсальной мезенхиме. **Б, В.** Утрата *Lmx1b* вызывает вентрализацию передней конечности, что очевидно по присутствию подушечек на обеих сторонах лап в мутантном фенотипе

тральной) эктодерме почки конечности у курицы и у мыши (рис. 19.22А; Dealy et al., 1993; Parr et al., 1993). Когда Парр и МакМагон (1995) экспериментально подавили активность гена *Wnt7a*, развились зародыши мыши с вентральными подушечками на обеих поверхностях их лап, т. е. *Wnt7a* необходим для дорсального паттернирования конечности.

Ген *Wnt7a* один из первых экспрессируется по дорсально-вентральной оси в ходе развития конечности. Он запускает активацию гена *Lmx1b* (известного также как *Lim1*) в дорсальной мезенхиме. *Lmx1b* кодирует транскрипционный фактор, необходимый для определения пути развития клеток конечности по дорсальному типу. Если белок *Lmx1b* экспрессировать в клетках вентральной мезенхимы, эти клетки разовьют дорсальный фенотип (Riddle et al., 1995; Vogel et al., 1995; Altabef and Tickle, 2002). Мутации по *lmx1b* у мыши и человека тоже показали значимость этого гена для спецификации дорсальных клеток конечности. Нокаут по *lmx1b* у мыши приводит к синдрому, при котором утрачивается дорсальный фенотип конечности и клетки дорсальной стороны приобретают вентральный статус, формируя подушечки пальцев, вентральные сухожилия и сесамовидные кости (все структуры специфичны для вентральной стороны; рис. 19.22Б, В). Схожим образом у людей утрата функции гена *LMX1B* приводила к синдрому ногтей–надколенников (не развиваются ногти на пальцах и надколенники), при котором дорсальные стороны конечностей были вентрализованы (Chen et al., 1998; Dreyer et al., 1998). Белок *Lim1*, возможно, направляет клетки на дифференцировку по дорсальному пути, что критично (см. гл. 15) для иннервации моторных нейронов, чьи ростовые конусы распознают ингибиторные факторы, синтезируемые дифференциально в дорсальной и вентральной частях почки конечности. И наоборот, транскрипционный фактор *Engrailed-1* маркирует вентральную эктодерму почки конечности и индуцируется подлежащей мезодермой за счет BMP (рис. 19.23). Если BMP был нокаутирован в ранней почке конечности, то *Engrailed-1* не экспрессируется и *Wnt7a* экспрессируется и в дорсальной, и в вентральной эктодерме. В результате развивается уродливая конечность, дорсальная с обеих сторон (Ahn et al., 2001; Pizette et al., 2001).

Кроме того, дорсально-вентральная ось координирована с двумя другими осями. У мышей с недостаточностью по *Wnt7a* описана ранняя утрата не только дорсальных структур конечности, но и задних пальцев, что подтверждает необходимость *Wnt7a* и для формирования передне-задней оси (Parr and McMahon, 1995). Янг и Нисвандер (1995) провели серию наблюдений на курином зародыше. Они удалили дорсальную эктодерму у развивающейся конечности и обнаружили, что в результате утрачиваются задние скелетные элементы конечности. Причина, по кото-

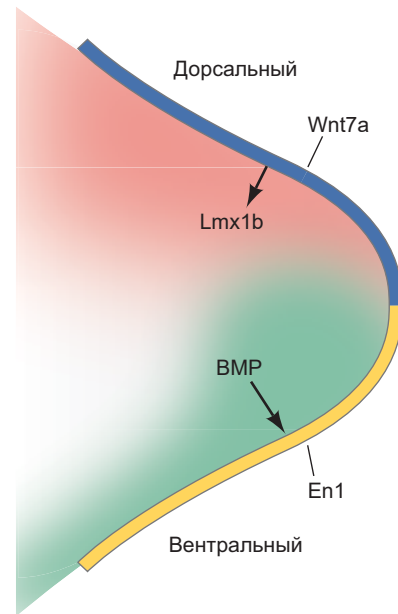


Рис. 19.23. Модель дорсально-вентрального структурирования почки конечности с помощью сигнальных путей Wnt и BMP. *Wnt7a* направляет клетки почки конечности по дорсальному пути через *Lmx1b*, тогда как сигнальный каскад BMP через *Engrailed-1* (*En1*) регулирует структуры вентральной части конечности. (По данным: K. Ahn et al., 2001. *Development* 128: 4449–4461.)

рой эти конечности были лишены задних пальцев, оказалась в значительном ослаблении экспрессии *Shh*. Экспрессия *Wnt7a*, индуцированная с помощью вирусного вектора, способна заменить сигнал для дорсальной эктодермы и восстановить экспрессию *Shh* и «задний» фенотип. Данные наблюдения показали, что синтез *Sonic hedgehog* стимулируется комбинацией белков *Fgf4* и *Wnt7a*. И наоборот, гиперактивированный сигнальный каскад Wnt в вентральной эктодерме приводит к росту АЭГ и дополнительных пальцев, и этот рост подтверждает, что структурирование по проксимально-дистальной оси не является независимым по отношению к формированию структур дорсально-вентральной оси (Loomis et al., 1998; Adamska et al., 2004).

Таким образом, в конце процесса разметки конечности BMP отвечают одновременно за прекращение работы АЭГ, опосредованное «выключение» ЗПА и ингибирование сигнала *Wnt7a* по дорсально-вентральной оси (Pizette et al., 2001). Сигнал BMP подавляет рост и структурирование по всем трем осям. При нанесении экзогенного BMP на АЭГ столбчатые эпителиальные клетки АЭГ возвращаются к кубической форме и перестают синтезировать FGF, а если BMP ингибировать с помощью *Noggin*, АЭГ продолжит существовать на несколько дней дольше, тогда как в норме он регрессирует (Gañan et al., 1998; Pizette and Niswander, 1999).

Гибель клеток и формирование пальцев и суставов

Апоптоз, или программированная клеточная гибель, играет роль в определении формы конечности тетрапод. Действительно, гибель клеток необходима для формирования наших суставов и для отделения наших пальцев друг от друга (Zaleske, 1985; Zuzarte-Luis and Hurlle, 2005). Гибель (или сохранение) определенных клеток в конечности позвоночных предопределена генетически и является результатом отбора в ходе эволюции.

Формирование аутоподия

Разница между лапой курицы и перепончатой лапой утки заключается в наличии или отсутствии гибели клеток между пальцами (**рис. 19.24**). Было показано, что после определенной стадии клетки между хрящами пальцев у курицы должны погибнуть, и происходит это будет, даже если их пересадить в другую область зародыша или поместить в культуру (Saunders et al., 1962; Saunders and Fallon, 1966). До этой стадии, однако, пересадка в зачаток конечности утки сохранит им жизнь. Между временем детерминации клеточной гибели и моментом гибели в клетке значительно уменьшаются уровни синтеза ДНК, РНК и белка (Pollak and Fallon, 1976).

Кроме **межпальцевой некротической зоны** существует еще три области, «ваяющие» конечность за счет гибели клеток. Локтевая и лучевая кости отделяются друг от друга **внутренней некротической зоной**, а **передняя** и **задняя некротические зоны** в дальнейшем определяют форму кон-

ца конечности (рис. 19.24Б; Saunders and Fallon 1966). Хотя зоны упоминают как некротические, этот термин является пережитком тех дней, когда между *некротической* (патологической или травматической) гибелью клеток и апоптотической гибелью клеток не делалось различий. Эти клетки гибнут путем апоптоза, и гибель клеток интердигитальной ткани связана с фрагментацией их ДНК (Mori et al., 1995).

Сигналом для апоптоза в аутоподии служат белки BMP; любопытно, что их экспрессия зависит от активно синтезирующейся РК между пальцами (Cunningham and Duester, 2015). BMP2, BMP4 и BMP7 экспрессируются в межпальцевой мезенхиме, и блокирование BMP (с помощью инфицирования клеток зоны прогресса ретровирусом, несущим доминантный негативный рецептор к BMP) предотвращает апоптоз между пальцами (Yokouchi et al., 1996; Zou and Niswander, 1996; Abara-Buis et al., 2011). Поскольку BMP экспрессируются во всей мезенхиме зоны прогресса, предполагается, что гибель этих клеток должна происходить по умолчанию, если только BMP не были активно подавлены. Подавление может происходить со стороны белка Noggin, синтезируемого в развивающихся хрящах пальцев и перихондральных клетках, окружающих их (Capdevila and Johnson, 1998; Merino et al., 1998). Если же Noggin экспрессировать во всей почке конечности, апоптоз не происходит.

Формирование суставов

Функция, впервые приписанная белкам BMP, — формирование, но не разрушение костной и хрящевой тканей. В развивающейся конечности BMP

Рис. 19.24. Характер гибели клеток в зачатках лап у зародышей утки (А) и курицы (Б). Синим показаны области гибели клеток. У утки области гибели клеток очень малы, тогда как в межпальцевой ткани лапы цыпленка имеются обширные области апоптоза. (По данным: J. W. Saunders and J. F. Fallon, 1966. In *Major Problems in Developmental Biology*, M. Locke [Ed.], pp. 289–314. Academic Press: New York and London.)



индуцируют мезенхимные клетки — в зависимости от стадии развития — либо к апоптозу, либо в хондроциты, продуцирующие хрящ. Те же BMP могут индуцировать гибель или дифференцировку клеток, в зависимости от истории отвечающей клетки. Такая **контекстная зависимость** от действия сигнала является главной идеей биологии развития. Масиас с коллегами (1997) показали, что на ранних стадиях развития почки конечности (до конденсации хряща) шарики, секретирующие BMP2 или BMP7, индуци-

руют апоптоз. Двумя днями позднее те же шарики вызывают формирование хряща из клеток почки конечности.

В нормально развивающейся конечности белки BMP используют обе эти возможности для формирования суставов. Несколько белков семейства BMP производится в перихондриальных клетках, окружающих скопления хондроцитов, что стимулирует последующее формирование хряща (рис. 19.25А). Другой BMP, белок GDF5, экспрессируется в области между костями, где будут сформированы суставы, и оказывается критически важным для их формирования (рис. 19.25Б; Macías et al., 1997; Brunet et al., 1998). Мутация по гену белка GDF5 у мышей вызывает брахиподию — состояние, характеризующееся утратой суставов пальцев (Storm and Kingsley, 1999). У мышей, гомозиготных по утрате функции антагониста BMP белка *Noggin*, не формируются суставы. Более того, BMP7 у зародышей, дефицитных по *Noggin*, вовлекает почти всю окружающую мезенхиму в формирование пальцев (рис. 19.25В).

Эволюция путем изменения сигнальных центров конечности

Чарльз Дарвин писал в «Происхождении видов»: «Что может быть любопытнее того, что пригодная для хватания рука человека, роющая лапа крота, нога лошади, ласт дельфина и крыло летучей мыши построены по тому же самому образцу и содержат одинаковые кости с одним и тем же относительным расположением?» Дарвин обратил внимание на то, что за различием между ногой лошади, ластом дельфина и рукой человека скрывается схожий принцип формирования костей. Он предположил, что эти кости произошли от общего предка, хотя не знал как. К. Х. Уоддингтон указал, что такая эволюция основана на изменении развития конечности, которое будет отобрано. Другими словами, он предположил, что изменения в развитии привели к возникновению новых разновидностей. Разновидности могли быть затем отобраны путем естественного отбора. Сейчас мы обнаружили несколько путей, с помощью которых «игра» с сигнальными молекулами в конечности может давать новые структуры конечности. Применительно к этим путям, изменения развития могут быть причиной эволюции конечности¹.

¹ Мы уже отмечали, что биологи развития привыкли думать в четырех измерениях. Эволюционные биологи развития должны думать в пяти измерениях: трех стандартных измерениях в пространстве, измерении времени развития (часы или дни) и измерении эволюционного времени (миллионы лет).

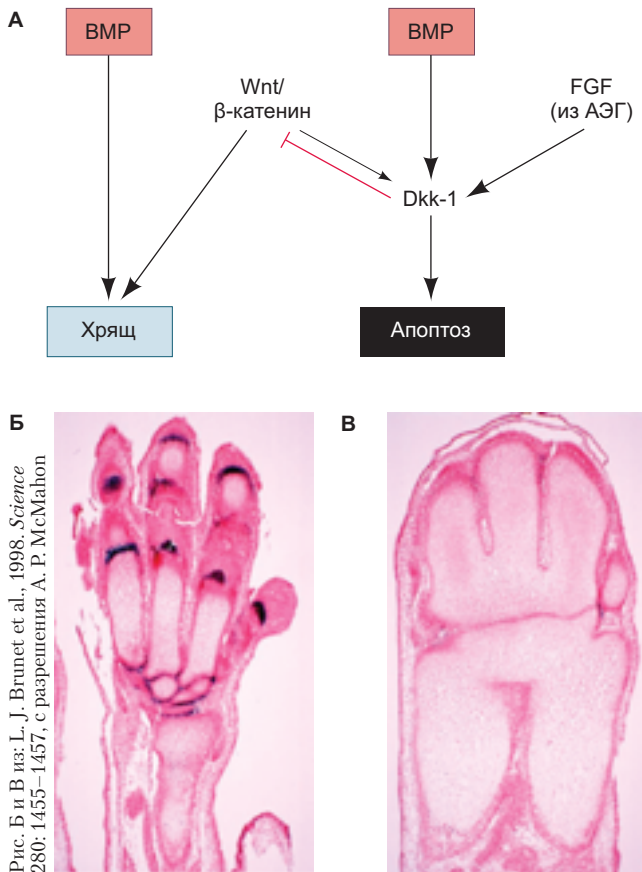


Рис. 19.25. Возможное участие BMP в стабилизации хряща и апоптоза. **А.** Модель двойной роли сигналов BMP в мезодермальных клетках конечности. BMP может быть воспринят клеткой в присутствии FGF (что вызовет апоптоз) или в присутствии Wnt (что индуцирует образование кости). В присутствии FGF из АЭГ активируется Dickkopf (Dkk). Этот белок опосредует апоптоз и в то же время ингибирует Wnt, чем предотвращает формирование скелета. **Б, В.** Эффекты белка *Noggin*. **Б.** Аутоподий 16,5-дневного зародыша мыши дикого типа, демонстрирующий экспрессию *GDF5* (темно-синий) в суставах. **В.** Аутоподий 16,5-дневного зародыша мыши, дефицитного по *Noggin*, демонстрирующий отсутствие суставов и экспрессии *GDF5*. Предположительно, в отсутствие *Noggin* BMP7 вызывает преобразование почти всей мезенхимы в хрящ. (Рис. А по данным: L. Grotewold and U. Rüther, 2002. *EMBO J* 21: 966–975.)

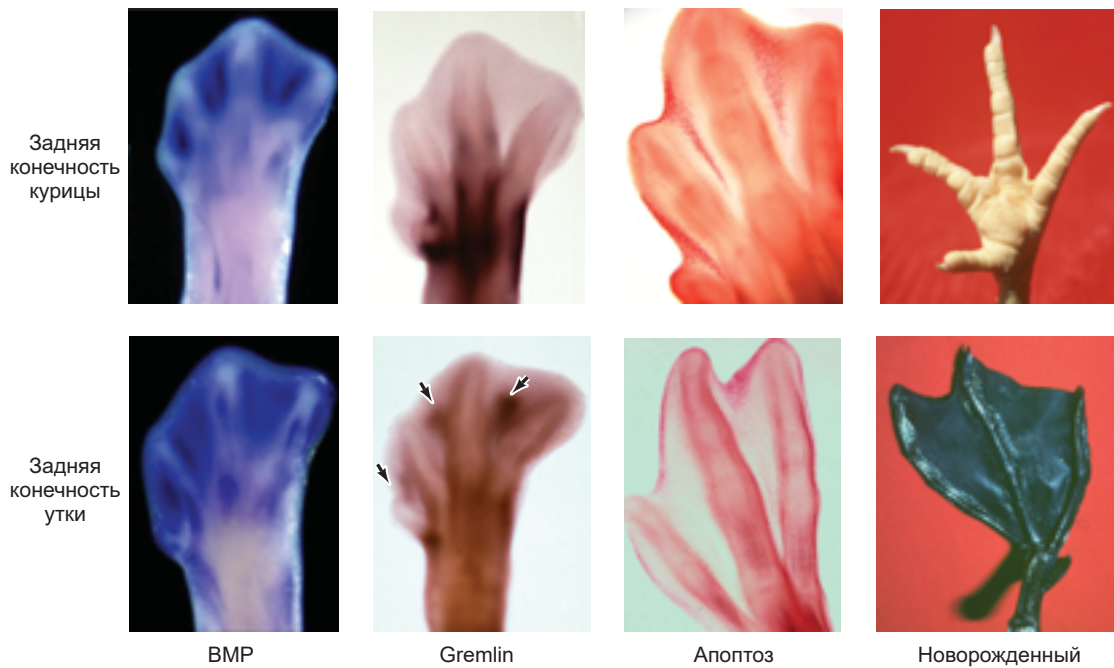


Рис. слева и справа с разрешения: J. Hurlle и E. Lauffer
Рис. в центре из: R. Merino et al., 1999, *Development* 126: 5515–5522, с разрешения J. Hurlle и E. Lauffer

Рис. 19.26. Аутоподии курицы (*верхний ряд*) и утки (*нижний ряд*) на одинаковых стадиях развития. Обе демонстрируют экспрессию BMP4 (*темно-синий*) в межпальцевой перепонке; BMP4 индуцирует апоптоз. В межпальцевых перепонках лапы утки (но не у курицы) экспрессируется ингибирующий BMP4 белок Gremlin (*темно-коричневый; стрелки*). Таким образом, лапа курицы подвергается апоптозу межпальцевой ткани (как видно по накоплению красителя нейтрального красного в умирающих клетках), а утиная лапа нет

ПЕРЕПОНЧАТОНОГИЕ ДРУЗЬЯ

Мы можем начать с формирования аутоподия. Регуляция BMP критична для создания перепончатой лапы утки (Lauffer et al., 1997b; Merino et al., 1999). Межпальцевые области лапы утки демонстрируют тот же паттерн экспрессии BMP, что и нога курицы. Но в то время как межпальцевые области лапы курицы оказываются подвергнутыми BMP-опосредованному апоптозу, развивающаяся лапа утки синтезирует ингибитор BMP Gremlin, который блокирует эту местную гибель клеток (**рис. 19.26**). Более того, разрушение перепонки на лапе у курицы можно предотвратить, если поместить в межпальцевые области шарики с белком Gremlin. Таким образом, эволюция птиц с перепончатыми лапами, возможно, вовлекала подавление BMP-опосредованного апоп-

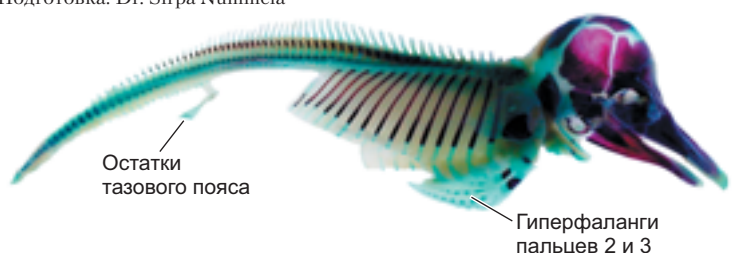
тоза в межпальцевых областях. В гл. 24 мы увидим, что зародыши летучей мыши используют схожий механизм, чтобы получить крылья.

ИГРА С СИГНАЛЬНЫМИ ЦЕНТРАМИ: СОЗДАВАЯ КИТОВ

Многочисленные ископаемые окаменелости свидетельствуют об эволюции современных китообразных (китов, дельфинов, морских свиней) от копытных сухопутных млекопитающих (Gingrich et al., 1994; Thewissen et al., 2007, 2009). Произошли многочисленные изменения в анатомии, но немногие из них столь поразительны, как преобразование передней конечности в плавник и одновременная элиминация задней конечности. Эти события со-

Рис. 19.27. Зародыш пантропического пятнистого дельфина *Stenella attenuata* в возрасте около 110 дней, окрашенный для демонстрации костей (*красный*) и хряща (*синий*). Гиперфаланги (очень длинные пальцы) видны на передней конечности (что коррелирует с продолжением экспрессии *Fgf8* в АЭГ), видна и рудиментарная задняя конечность (что коррелирует с уменьшением передачи сигналов АЭГ после исхода *Shh* из ЗПА).

Из: L. N. Cooper 2009. PhD thesis, Kent State University; с разрешения L. N. Cooper и the Thewissen laboratory.
Подготовка: Dr. Sirpa Nummela



проводились изменениями сигнальных центров в почке конечности у предковых китообразных; изменения происходили тремя путями. Во-первых, сигнал FGF из АЭГ передней конечности поддерживался в течение длительного времени, что привело к формированию более длинных пальцев путем продолжающегося добавления фаланг. Во-вторых, межпальцевый апоптоз был предотвращен блокированием BMP путем, схожим с описанным выше для лапы утки. В-третьих, сигнал Sonic hedgehog из ЗПА задней конечности был утрачен в ран-

нем развитии. Поскольку сигнал из ЗПА исчез, активность АЭГ не могла поддерживаться и задняя конечность не смогла развиваться (Thewissen et al., 2006). На **рис. 19.27** показано удлинение фаланг плавников и укороченные задние конечности зародыша дельфина. Таким образом, несмотря на утверждения креационистов о том, что происхождение китов от сухопутных млекопитающих невозможно (Gish, 1985), фактически комбинация биологии развития и палеонтологии объясняет этот феномен чрезвычайно четко.



По данным: L. S. Honig and D. Summerbell, 1985.
J Embryol Exp Morphol 87: 163–174

О фотографии в начале главы

Возможно, наиболее подходящий вопрос для этого изображения будет: «Какой палец я показываю?» Скелетные элементы крыла курицы демонстрируют зеркальное удвоение пальцев, которое, как мы знаем, происходит из-за нарушения экспрессии Sonic hedgehog на переднем крае почки конечности. Градиенты сигнальных факторов вдоль главных осей необходимы для формирования правильного числа и паттерна структур в руке. Так же важны для развития конечности генная регуляторная сеть, регулирующая Нох-гены, и самоорганизующиеся взаимодействия между клетками, которые в конечном счете «строят» ткани конечности.

19

Коротко Развитие конечности тетрапод

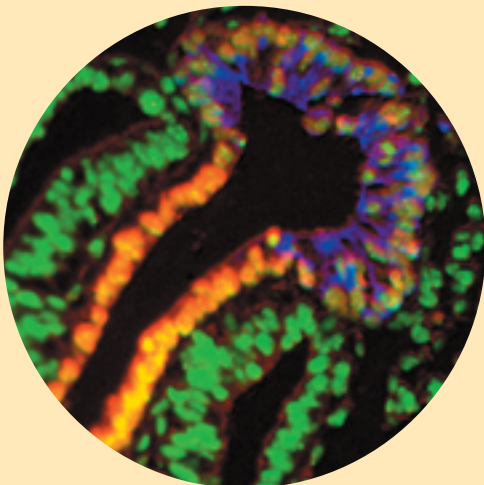
1. Положение на оси тела, где появляются конечности, зависит от экспрессии Нох-генов.
2. Проксимально-дистальную ось развивающейся конечности инициирует индукция эктодермы на дорсально-вентральной границе белком Fgf10, выделяемым мезенхимой. За счет индукции формируется апикальный эктодермальный гребень (АЭГ). АЭГ секретирует Fgf8, который поддерживает лежащую под ним мезенхиму в пролиферирующем и недифференцированном состоянии. Эту область мезенхимы называют зоной прогресса.
3. Tbx5 индуцирует переднюю конечность, тогда как Tbx4 (у курицы) и Islet1 (у мыши) индуцируют заднюю конечность.
4. Два противодействующих градиента, первый — FGF и Wnt из АЭГ и второй — ретиноевая кислота из фланкирующей (боковой) ткани (расположенной между зачатками передней и задней конечностей), паттернируют передне-заднюю ось конечности у курицы.
5. По мере роста конечности первым образуется стилоподий, за ним зигоподий и затем — аутоподий. Каждую фазу развития конечности характеризует специфичный паттерн экспрессии Нох-генов.
6. Модель Тьюринга подтверждает, что реакционно-диффузионный механизм может объяснить стабильный паттерн «стилоподий–зигоподий–аутоподий», наблюдаемый в конечности тетрапод.
7. Передне-заднюю ось определяет экспрессия Sonic hedgehog в зоне поляризующей активности (ЗПА) — области мезодермы в задней части почки конечности. Если ткань ЗПА (либо клетки или шарики, выделяющие Shh) поместить на передний край почки конечности, то наблюдается второй, зеркально отраженный паттерн экспрессии Нох-генов, сопровождающийся зеркальной дубликацией пальцев.
8. ЗПА поддерживается за счет взаимодействия FGF из АЭГ с мезенхимой, ставшей компетентной к экспрессии Sonic hedgehog путем экспрессии отдельных Нох-генов. Sonic hedgehog действует в обратную сторону, возможно, опосредованно, чтобы изменить экспрессию Нох-генов в почке конечности.
9. Sonic hedgehog обеспечивает спецификацию пальцев как минимум двумя путями. Он действует через ингибирование BMP в межпальцевой мезенхиме, а также регулирует пролиферацию клеток будущего хряща пальцев.

10. Дорсально-вентральная ось формируется в том числе благодаря экспрессии *Wnt7a* в дорсальной части эктодермы конечности. *Wnt7a* поддерживает также уровень экспрессии *Sonic hedgehog* в ЗПА и уровень *Fgf4* в задней части АЭГ. *Fgf4* и *Shh* реципрокно влияют на экспрессию друг друга.
11. Уровни FGF в АЭГ могут как стимулировать, так и подавлять синтез *Shh* в ЗПА. Экспрессия *Shh* подавляется по мере роста почки конечности и продукции все большего количества FGF в АЭГ. Это, в свою очередь, вызывает снижение уровня FGF и в конечном счете прекращение роста в проксимально-дистальном направлении.
12. Гибель клеток в конечности опосредована BMP и необходима для формирования пальцев и суставов. Различие между лишенной перепонки лапой курицы и перепончатой лапой утки может быть объяснено различиями в экспрессии *Gremlin* (белка-антагониста BMP).
13. Путем изменения секреции паракринных факторов могут быть сформированы конечности разного строения, такие как перепончатые лапы, плавники или руки. Подавлением синтеза паракринных факторов формирование конечности может быть вообще предотвращено (как в случае китов).
14. BMP вовлечены и в апоптоз, и в дифференцировку мезенхимных клеток в хрящ. Регуляция эффектов BMP белками *Gremlin* и *Noggin* критична в формировании суставов между костями конечности, а также регуляции проксимально-дистального роста.

Энтодерма:

трубки и органы для пищеварения и дыхания

Почему некоторые клетки кишки
становятся клетками поджелудочной
железы, а соседние с ними образуют
печень или кишечник?



С разрешения: Ken S. Zaret

Энтодерма образует эпителий кишечника и респираторные трубки *взрослых* амниот, которым они необходимы для газообмена и питания. Первая и главная функция энтодермы в организме *зародыша* амниот, получающего питательные вещества и кислород через плаценту от матери, заключается в том, что она вызывает образование некоторых органов мезодермального происхождения. Как было показано в предыдущих главах, присутствие энтодермы имеет решающее значение для формирования хорды, сердца, кровеносных сосудов и даже мезодермального герминального слоя. Вторая функция эмбриональной энтодермы — формирование двух трубок в теле позвоночных. **Пищеварительная трубка** простирается на всю длину тела зародыша; впоследствии от нее отпочковывается печень, желчный пузырь и поджелудочная железа. **Дыхательная трубка** формируется как отросток пищеварительной трубки и со временем раздваивается с образованием двух легких. **Глотка** образуется из anteriорной области кишечника относительно точки ответвления дыхательной трубки. Третья эмбриональная функция заключается в образовании эпителия некоторых желез. Из эпителиальных отростков глотки образуются миндалины, щитовидная железа, тимус и паращитовидные железы.

Энтодерма возникает из двух источников. Основным источником служат клетки, проникающие внутрь эмбриона через первичную полоску во время гастрюляции. Такую энтодерму называют **дефинитивной**. Она заменяет **висцеральную энтодерму**, которая главным образом формирует желточный мешок. При этом явлении удаляется не вся висцеральная энтодерма. Исследования с использованием витальных флуоресцентных красителей показывают, что висцеральная энтодерма не замещается дефинитивной в виде клеточного пласта (**рис. 20.1**; Kwon et al., 2008;

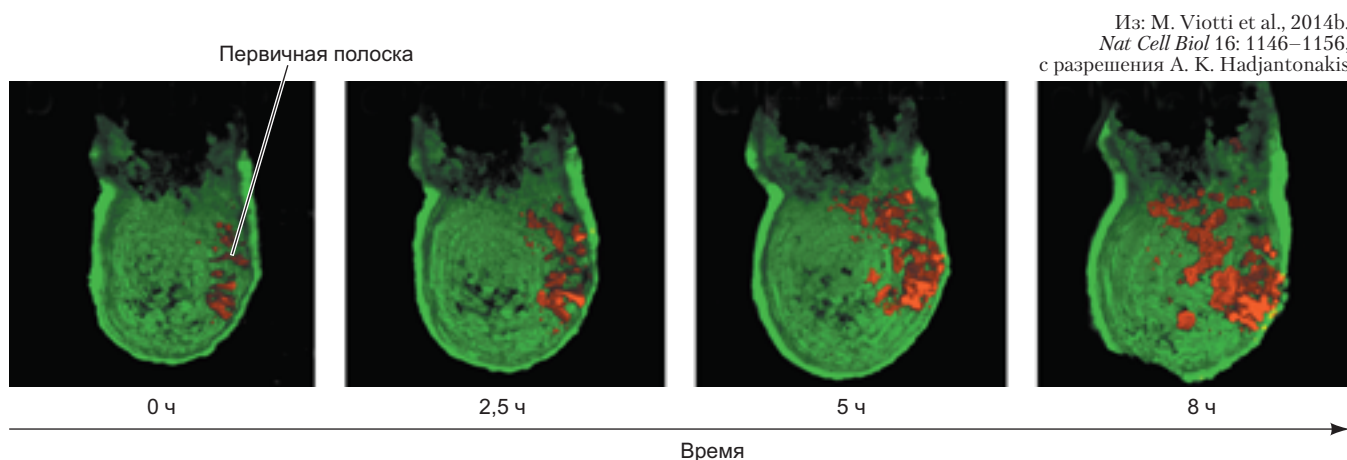


Рис. 20.1. Клетки дефинитивной энтодермы из эпибласта заменяют клетки висцеральной энтодермы в эмбрионе мыши. На данном рисунке висцеральная энтодерма эмбриона была генетически маркирована зеленым флуоресцентным белком; с окрашиванием становится заметно, как она окружает эпибласт. Клетки эпибласта метили красным красителем случайным образом и производили съемку, как те мигрировали через примитивную полосу и заменяли клетки висцеральной энтодермы

Viotti et al., 2014a), а скорее отдельные клетки дефинитивной энтодермы интеркалируют в висцеральный слой. Потомки таких клеток эпибласта остаются в зародышевой части, в то время как большая часть исходной висцеральной энтодермы становится внезародышевой (но не вся). Транскрипционный фактор *Sox17* служит маркером энтодермы у многих видов; ген *Sox17*, по-видимому, активируется в некоторых клетках, покидающих первичную полосу. У мутантных особей с отсутствием гена *Sox17* дефинитивная энтодерма не образуется (Viotti et al., 2014b).

Присутствие белка *Sox17* отличает клетки дефинитивной энтодермы от мезодермальных клеток, которые также проходят через первичную полосу; мезодермальные клетки экспрессируют ген транскрипционного фактора *Brachyury*, который наиболее важен для развития мезодермы. Какой фактор будет экспрессироваться в клетке, *Sox17* или *Brachyury*, зависит от концентрации секретируемого висцеральной энтодермой белка *Nodal*. Высокий уровень концентрации *Nodal* индуцирует экспрессию *Sox17*, в то время как BMP и FGF ингибируют *Nodal* и специфицируют мигрирующие клетки в мезодермальном направлении (рис. 20.2; Vincent et al., 2003; Dunn et al., 2004).

Далее выделяют три отдела эмбриональной кишки, расположенных вдоль антерио-постериорной оси тела и образованных дефинитивной энтодермой. (Gordillo et al., 2015). На данный момент становится совершенно ясно, что эту ось тела позвоночных животных определяют градиенты белков Wnt, FGF и BMP, имеющих наиболее высокую концентрацию на постериорном конце (рис. 20.2). Энтодерма в головном отделе дает клетки передней кишки, которые впоследствии станут предшественниками легких

и щитовидной железы. Энтодерма в постериорном отделе становится тяжем клеток-предшественников средней и задней кишки, а также кишечника. Участок между ними (в области умеренной концентрации белков BMP, FGF и Wnt) становится зачатком задней кишки. Эти клетки дают начало эпителию поджелудочной железы и печени.

Первоначально клетки кишечника образуют плоский клеточный пласт под эмбрионом (у курицы или человека) или вокруг зародыша (у мыши). Из плоского пласта дефинитивной энтодермы эти клетки образуют трубку. Развитие кишечной трубки у млекопитающих начинается с двух концов, которые движутся навстречу друг другу и сливаются в середине с образованием средней кишки (Lawson et al., 1986; Franklin et al., 2008). В передней кишке клетки боковых отделов антериорной энтодермы мигрируют вентрально, образуя **передние кишечные ворота**; **задние кишечные ворота** образуются из постериорной энтодермы (рис. 20.3).

Отверстия на переднем и заднем концах кишечной трубки — единственные области эмбриона, где энтодерма непосредственно контактирует с эктодермой. Сначала передний конец трубки закрыт участком энтодермальных клеток, контактирующих с ротовой эктодермой (**стомодеум**) на **оральной пластинке**. Впоследствии ротовая пластинка разрывается (примерно на 22-й день развития у человеческих эмбрионов), открывая оральное отверстие пищеварительной трубки. Отверстие изнутри выстлано эктодермальными клетками. Возникает интересная ситуация, так как эктодерма ротовой пластинки контактирует с эктодермой головного мозга, которая изогнута в вентральном направлении относительно эмбриона. Эти эктодермальные области взаимодействуют друг

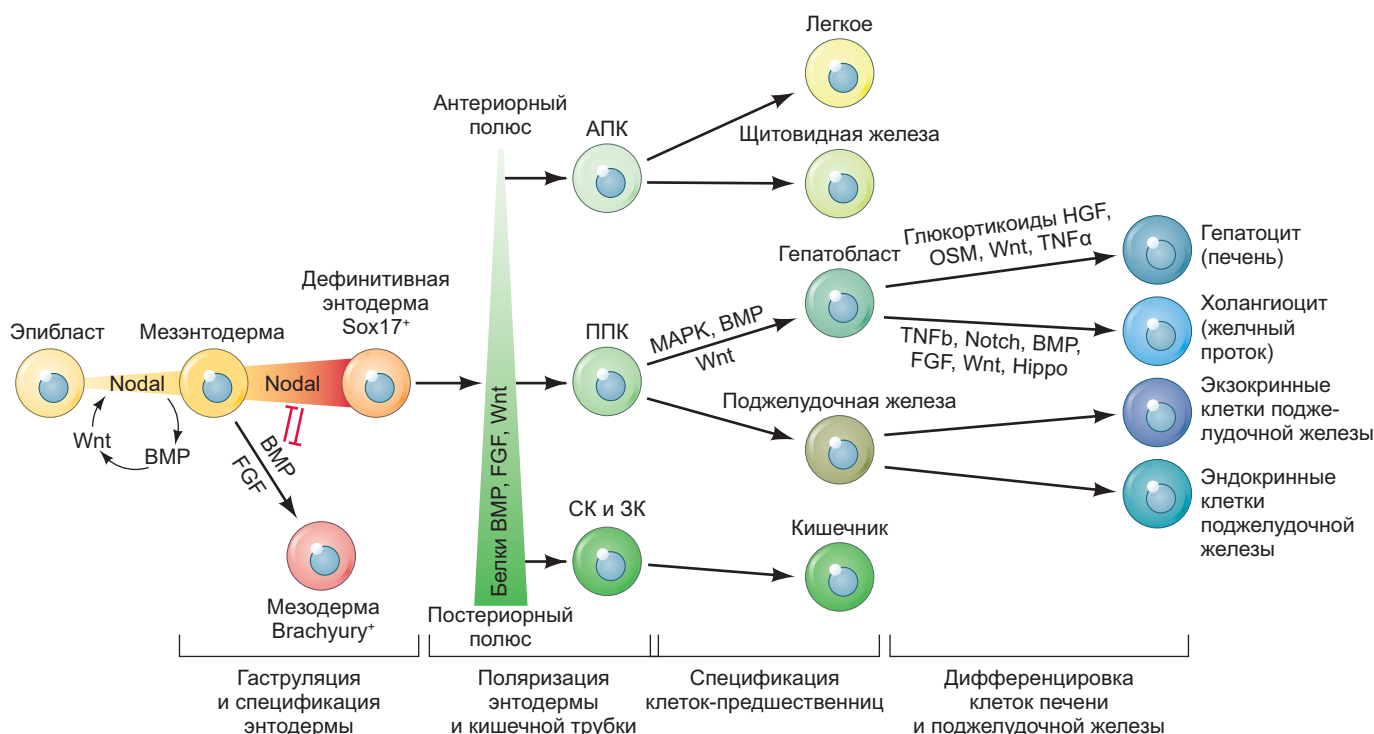


Рис. 20.2. Сигналы, участвующие в определении пути развития предшественников энтодермы. Сигналинг Nodal активирует клетки эпибласта для миграции через первичную полосу и образования мезодермы. Клетки, подвергшиеся воздействию высоких концентраций Nodal, становятся клетками дефинитивной энтодермы. Клетки, которые получают сигналы BMP и FGF, потенциально становятся мезодермальными. Дальнейшее развитие дефинитивной энтодермы в значительной степени зависит от того, где находятся клетки относительно антерио-постериорной оси. На заднем конце тела они под воздействием высоких концентраций Wnt, BMP и FGF становятся клетками средней и задней кишки (СК и ЗК), которые образуют кишечник. Клетки, подвергающиеся воздействию более низких уровней этих паракринных факторов, дают начало клеткам постериорной части передней кишки (ППК), предшественникам клеток печени (гепатоцитов и холангиоцитов) и поджелудочной железы (которые будут делиться на предшественников экзокринных и эндокринных клеток). Клетки дефинитивной энтодермы, получающие низкие концентрации этих паракринных факторов, дают начало антериорным клеткам передней кишки (АПК), которые становятся предшественниками легкого и щитовидной железы. Многие клеточные линии не включены для упрощения. (Из: M. Gordillo et al., 2015. *Development* 142: 2094–2108.)

с другим, причем крыша ротовой области образует карман Ратке и становится железистой частью гипофиза. Нервная ткань дна промежуточного мозга дает начало воронке, которая становится нейральной частью гипофиза. Таким образом, гипофиз имеет двойственное происхождение, что отражается на его функции во взрослом организме. Аналогичная встреча эктодермы и энтодермы происходит в области ануса, что называют **аноректальным соединением**.



Загадки развития

Кишечная трубка не симметрична. Она изгибается в определенных направлениях, располагая желудок рядом с сердцем, а аппендикс с правой стороны тела. Какие клеточные и молекулярные механизмы вызывают появление петель кишечника?

Глотка

Антериорная энтодермальная часть пищеварительной и дыхательной трубок начинается глоткой. Используя репортерный ген (вышеупомянутый *Sox17*), активирующийся только в энтодерме, Ротхова и коллеги (2012) обнаружили, что существует разделение между эктодермой и энтодермой в ротовой полости млекопитающих. У млекопитающих эпителиальные слои зубов и большая часть слюнных желез формируются из эктодермы. Эпителий передних вкусовых сосочков имеет эктодермальное происхождение (образуется из черепных плакод; см. гл. 16), однако эпителий задних вкусовых сосочков, а также некоторые задние слюнные и слизистые железы образуются из энтодермы.

Зародышевая глотка у млекопитающих содержит четыре пары энтодермальных **глочных карманов**. Между карманами находятся четыре пары **жабер-**

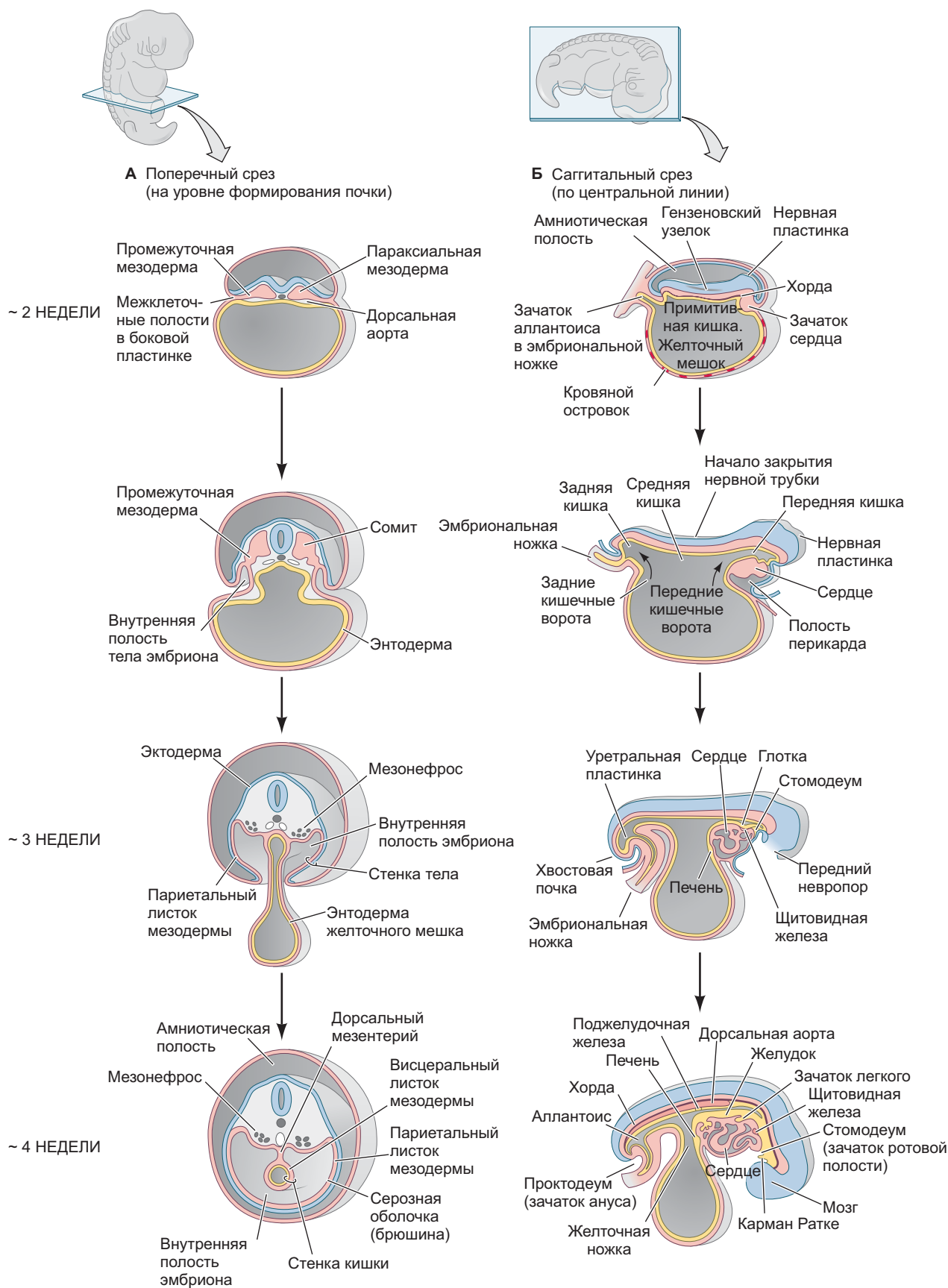


Рис. 20.3 Формирование энтодермы на раннем этапе развития человека. **А.** Поперечный срез в области образования почки. **Б.** Сагитальный срез по центральной линии эмбриона. (Из: T. W. Sadler, 2009. *Langman's Medical Embryology*. Lippincott, Williams & Wilkins: Hagerstown, MD.)

ных дуг (рис. 20.4). Первая пара глоточных карманов формирует слуховые полости среднего уха и связанные с ними евстахиевы трубы. Вторая пара дает начало стенкам миндалин. Тимус формируется из третьей пары глоточных карманов; на более поздних стадиях развития тимус будет направлять дифференцировку Т-лимфоцитов. Также из третьей пары развивается одна пара паращитовидных желез, в то время как другая их пара формируется из четвертой пары карманов. В свою очередь на дне глотки, между глоточными карманами второй пары, образуется небольшой центрально расположенный вырост (дивертикул). Этот энтодермально-мезодермальный дивертикул отпочковывается от глотки и мигрирует в область шеи, где становится щитовидной железой. Как мы скоро увидим, дыхательная трубка прорастает из глоточного дна (между глоточными карманами четвертой пары), образуя легкие.

Многочисленные потоки клеток краниального нервного гребня мигрируют в глоточные карманы, которые формируют щитовидную и околощитовидные железы, а также тимус. Белок *Sonic hedgehog*, экспрессируемый в энтодерме, по всей видимости, действует как фактор выживания, предотвращая апоптоз клеток нервного гребня (Moore-Scott and Manley,

2005). Кроме того, генетический анализ в сочетании с трансплантационными исследованиями на *Danio* показал, что FGF (в основном Fgf3 и Fgf8) из эктодермы и мезодермы важны не только для миграции и выживания клеток нервного гребня, но и для формирования самих глоточных карманов. У мышей, дефектных по генам *Fgf8* и *Fgf3*, не развиваются глоточные карманы, даже в присутствии энтодермы. Энтодерма остается в передней части глотки, вместо того чтобы латерально и вентрально мигрировать для формирования карманов (Crump et al., 2004).

Кишечная трубка и ее производные

Во время образования энтодермальной трубки мезенхимные клетки внутренней части мезодермы боковой пластинки обрастают энтодерму (рис. 20.3). Энтодермальные клетки образуют только слизистую оболочку пищеварительной трубки и ее железы, в то время как мезенхимные клетки висцеральной мезодермы окружают трубку для дальнейшего формирования соединительной ткани и гладкой мускула-

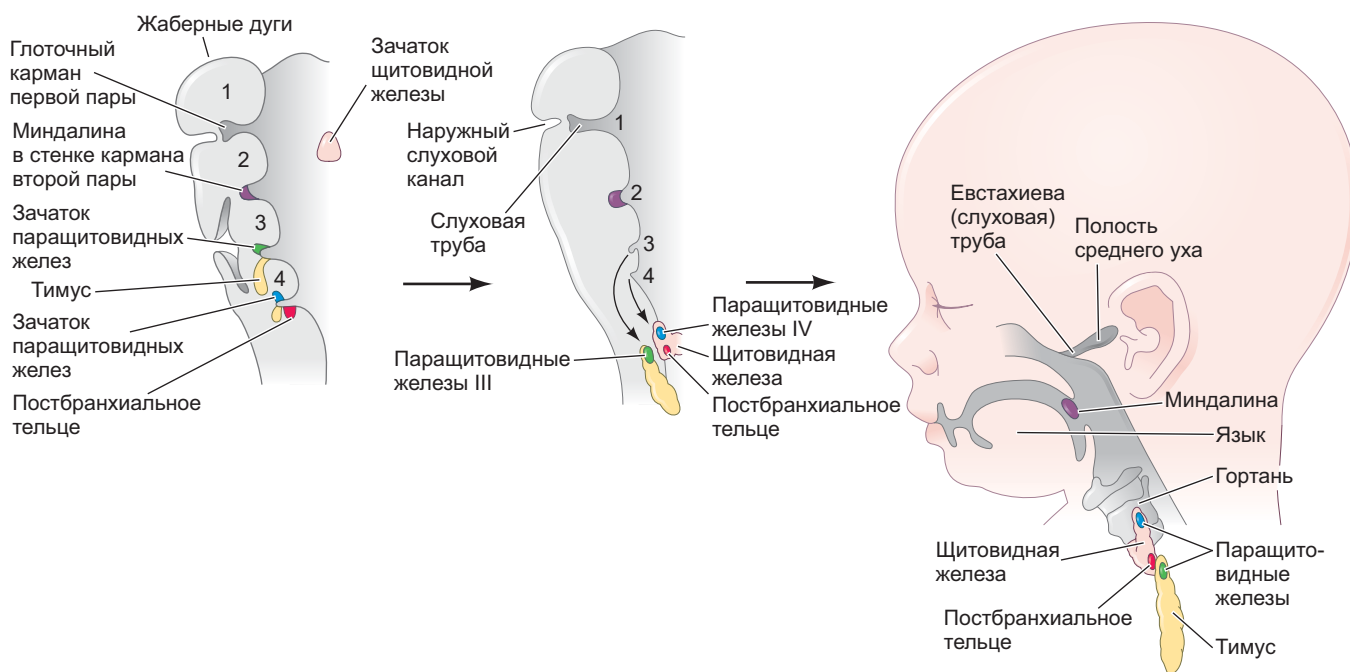


Рис. 20.4. Формирование зачатков желез из глоточных карманов. Карманы симметричны; показана только правая сторона. Конец каждого из глоточных карманов первой пары становится полостью среднего уха и евстахиевой трубой. Вторая пара карманов получает скопления лимфоидной ткани и становится миндалинами. Дорсальная часть третьей пары образует часть паращитовидной железы, а вентральная часть — тимус. Обе части мигрируют каудально и встречаются с тканями четвертой пары глоточных карманов, образуя оставшуюся часть паращитовидной железы и постбранхиальное тело. Щитовидная железа, возникающая по средней линии глотки, также мигрирует каудально в область шеи. (Из: B. M. Carlson, 2014. *Human Embryology and Developmental Biology*, Fifth Edition, pp. 294–334. Elsevier/Saunders: Philadelphia.)

туры, обеспечивающей перистальтические сокращения. За глоткой пищеварительная трубка сужается, образуя пищевод, за которым последовательно идут желудок, тонкая и толстая кишка.

Как показано на **рис. 20.5А**, желудок развивается как расширение области кишки, близкой к глотке. Кишечник развивается более каудально и со временем его связь с желточным мешком разрушается. Изначально кишечник заканчивается в энтодермаль-

ной клоаке, но, после того как клоака разделяется на область мочевого пузыря и прямой кишки (см. гл. 18), кишечная трубка соединяется с прямой кишкой. На каудальном конце прямой кишки образуется углубление, в котором энтодерма встречается с вышележащей эктодермой, а разделяет их тонкая **клоакальная мембрана**. Когда мембрана клоаки в конечном счете разрывается, образующееся отверстие становится анусом.

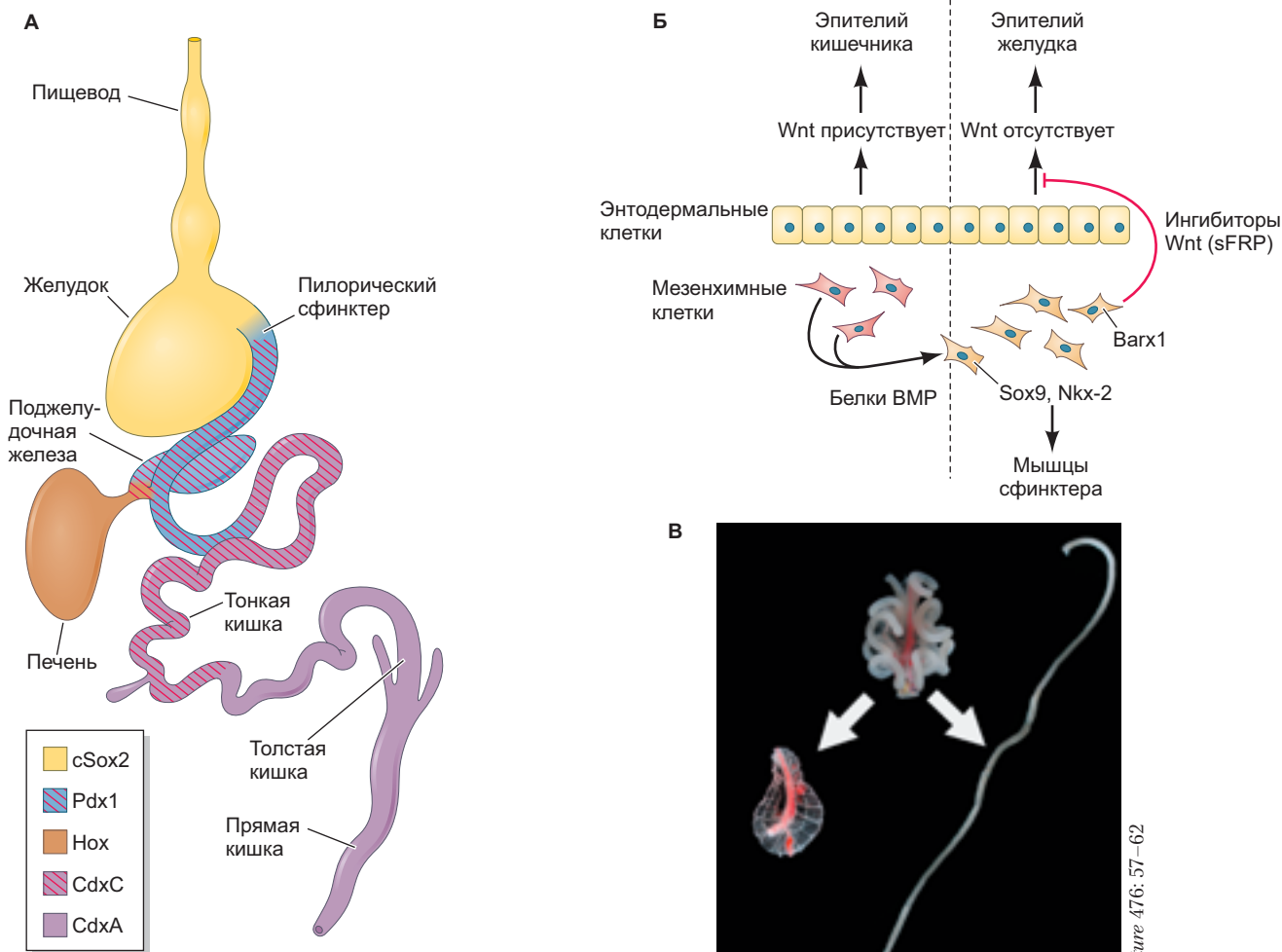


Рис. 20.5. Зональная спецификация кишечной энтодермы и спланхической (висцеральной) мезодермы посредством реципрокных взаимодействий. **А.** Зональные транскрипционные факторы (зрелой) энтодермы кишечника цыпленка. (CdxA и CdxC у птиц являются гомологами Cdx1 и Cdx2.) Эти факторы выявляются до взаимодействия с мезодермой. **Б.** Предположительно, мезенхимные клетки инструктируют энтодерму образовывать кишечник или желудок в зависимости от расположения. **В.** Изначальное кишечно-брыжеечное соединение (*вверху*) удерживает пищеварительный тракт на месте. Хирургическое разделение энтодермальной кишечной трубки цыпленка и дорсального мезентерия (брыжейки) на 20-е эмбриональные сутки приводит к тому, что мезентерий (*слева*) сжимается, а кишка (*справа*) остается прямой. (Рис. А по данным: A. Grapin-Botton et al., 2001. *Genes Dev* 15: 444–454; рис. Б по данным: B. M. Kim et al., 2005. *Dev Cell* 8: 611–622; рис. В по данным: T. Savin et al., 2011. *Nature* 476: 57–62.)

Из: T. Savin et al., 2011. *Nature* 476: 57–62

Спецификация кишечной ткани

Одним из первых принятых эмбрионом решений является решение об образовании энтодермы, и для такой спецификации критически необходим транскрипционный фактор белок Sox17. У эмбрионов амфибий клетки, экспрессирующие Sox17, автоматически становятся энтодермальными. Доминантнонегативные формы Sox17 (имеющие репрессивные субъединицы вместо активаторных) блокируют образование энтодермы в blastomeres вегетативного полюса амфибий, в то время как сверхэкспрессия формы гена дикого типа расширяет область энтодермы (Hudson et al., 1997; Henry and Melton, 1998). У мышей и рыбок *Danio*, дефектных по гену *Sox17*, формируется аномальная энтодерма кишечника, а если экспериментально вызвать экспрессию *Sox17* в эмбриональных стволовых клетках, последние образуют энтодермальные производные (Kanai-Azuma et al., 2002; Takayama et al., 2011).

Несмотря на то что Sox17 помогает в спецификации пищеварительной трубки, он не задает ей значимую полярность. Пищеварительная трубка пролегает от глотки к анусу, дифференцируясь соответственно в пищевод, желудок, двенадцатиперстную кишку и кишечник, и дает ветви, которые становятся (помимо прочего) эпителием щитовидной железы, тимуса, поджелудочной железы и печени. Откуда энтодермальная трубка «узнает», что она должна дать определенные ткани в определенных местах? Почему мы никогда не встречаем людей, у которых рот открывается прямо в желудок? У энтодермы и спланхнической (висцеральной) мезодермы боковой пластинки существует сложная система взаимодействий, в то время как сигналы для формирования различных тканей кишки, по-видимому, консервативны для всех классов позвоночных (Wallace and Pack, 2003). Согласно одной из возможных моделей, поляризация кишечной трубки начинается со спецификации глотки, а затем — остальной части кишечной трубки. Исследования на куриных эмбрионах с использованием шариков, содержащих либо ретиноевую кислоту (РК), либо ингибиторы ее синтеза (Bayha et al., 2009), показывают, что глотка может развиваться только в областях, где РК либо содержится в низких концентрациях, либо отсутствует. Градиент РК формирует энтодерму глоточных дуг подобно градуировке. Вероятно, это достигается путем активации и подавления экспрессии определенных групп генов факторов транскрипции.

Считается, что во второй фазе спецификации кишки участвуют сигналы от спланхнической мезодермы, происходящей из мезодермы, окружающей энтодермальную трубку. Как пищеварительная трубка контактирует с различными участками мезенхимы, так мезенхимные клетки инструктируют энтодерму дифференцироваться в пищевод, желудок, тонкую и толстую кишку (Okada, 1960; Gumpel-Pinot et al., 1978; Fukumachi and Takayama, 1980; Kedinger et al., 1990.)

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

WNT И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПУТИ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ РАЗВИТИЕ КИШЕЧНОЙ ТРУБКИ

Считается, что сигналы Wnt особенно важны при зонировании кишечной трубки. Изначально («по умолчанию») вся кишечная трубка специфицируется как передняя кишка (т. е. желудок/пищевод). Однако градуированный Wnt-сигналинг от постериорной мезодермы (обусловлен градиентами РК и FGF) обеспечивает сигнал, который индуцирует в энтодерме кишки постеризующие транскрипционные факторы Cdx1 и Cdx2 (рис. 20.5А), а также паракринный фактор Indian hedgehog. Фактор транскрипции Cdx при высоких концентрациях вызывает образование толстой кишки, а при более низких — тонкой кишки. Действительно, если искусственно вызвать экспрессию β -катенина в ткани передней кишки, активируется ген *Cdx2* и антериорная ткань кишки трансформируется в более постериорный тип энтодермы (Sherwood et al., 2011; Stringer et al., 2012).

Молекулярные пути, в которых мезенхимные сигналы Wnt влияют на кишечную трубку, в настоящее время только исследуют (рис. 20.5Б). Так, Cdx2 подавляет гены, подобные *Hhex*, и тем самым предотвращает образование желудка, печени и поджелудочной железы в задней части зародыша (Bossard and Zaret, 2000; McLin et al., 2007). В передних отделах кишечной трубки (образующих тимус, поджелудочную железу, желудок и печень) блокируется передача сигналов Wnt. Мезенхима, выстилающая кишечную трубку в области, где образуется желудок, экспрессирует транскрипционный фактор Barx1, который активирует выработку двух Frzb-подобных Wnt-антагонистов (белков sFRP1 и sFRP2). Белки блокируют передачу сигналов Wnt в зоне развития желудка, в кишечнике этот механизм неактивен. (Действительно, у мышей с дефицитом *Barx1* не развивается желудок, на его месте в ткани экспрессируются маркеры кишечника; Kim et al., 2005.)

Полярность, основанная на Wnt-сигналинге, иногда возникает временно и впоследствии может потребоваться дальнейшее взаимодействие энтодермы и окружающей ее мезенхимы. Такие взаимодействия могут включать участие Shh, который синтезируется в энтодерме и секретируется в разных концентрациях, в зависимости от расположения, что вызывает вложенный паттерн дифференциальной экспрессии Нох-генов в мезодерме, окружающей кишечную трубку (Roberts et al., 1995; 1998). На данный момент уже существуют доказательства важности Нох-генов для развития задней кишки (Roberts et al., 1995; Yokouchi et al., 1995): в этой области нарушенная при помощи

ретровируса экспрессия генов Нох в мезодерме влияет на изменение в дифференцировке близлежащей энтодермы (Roberts et al., 1998). Считается, что Нох-гены специфицируют мезодерму для дальнейшего взаимодействия с энтодермальной трубкой и более точной разметки ее областей.



Загадки развития

Одним из частых пороков развития у человека является пилоростеноз — патология, при которой мускулатура пилорического сфинктера утолщается и не дает пище попасть в кишечник. Каковы происхождение и функция этой мускулатуры и что может вызывать данный порок?

Как только границы транскрипционных факторов установлены, может начинаться дифференцировка. Зональная дифференцировка мезодермы (в гладкую мускулатуру) синхронизирована с зональной дифференцировкой энтодермы (в различные функциональные единицы: желудок, двенадцатиперстную и тонкую кишку). Так, в некоторых областях мезенхима кишечника инструктирует более антериорную мезодерму формировать гладкую мускулатуру именно пилорического сфинктера, а не гладкие мышцы желудка или кишечника (рис. 20.5Б; Theodosiou and Tabin, 2005).

Взаимодействие спланхнической мезодермы и энтодермы продолжается после спецификационной стадии развития. Один из производных спланхнической мезодермы — **дорсальный мезентерий** (брыжейка), фиброзная пленка, которая связывает кишку со стенкой тела. Появление петель кишечника обусловлено тем, что энтодермальная ткань трубки растет, будучи связанной с дорсальной брыжейкой (Savin et al., 2011). Если разорвать соединение, брыжейка сжимается, а кишка образует длинную тонкую трубку и не формирует изгибов (рис. 20.5В).

Взаимодействия мезодермы и энтодермы важны и для формирования ворсинок кишки. Дифференцировка гладких мышц в мезодерме вызывает сжатие подлежащей растущей энтодермы и мезенхимы, создавая таким образом сдавливающее напряжение, которое влечет за собой деформацию энтодермы и образование ворсинок (Shyer et al., 2013). Вследствие этого воздействия кишечные стволовые клетки локализуются у основания ворсинок. Первоначально все клетки кишечной трубки могут стать стволовыми, но сгибание позволяет некоторым тканям кишечника действовать активнее других и вызывает экспрессию ингибирующих паракринных факторов (из них наиболее важен BMP4), ограничивающих образование стволовых клеток в областях, которые находятся дальше всего от кончика ворсинки (Shyer et al., 2015).

Придаточные органы: печень, поджелудочная железа и желчный пузырь

Энтодерма образует слизистую оболочку трех придаточных органов — печени, поджелудочной железы и желчного пузыря, которые развиваются непосредственно позади желудка. **Печеночный дивертикул** отпочковывается от энтодермы и выходит от передней кишки в окружающую мезенхиму. Образующая этот зачаток энтодерма происходит из двух популяций клеток: латеральной, которая дает только клетки печени, и вентрально-медиальной, которая образует некоторые производные средней кишки, включая печень (Tremblay and Zaret, 2005). Мезенхима вызывает пролиферацию энтодермы, ее ветвление и формирование железистого эпителия печени. Часть печеночного дивертикула (наиболее близкая к пищеварительной трубке) продолжает функционировать в качестве дренажного протока печени, а ответвление этого протока образует желчный пузырь (рис. 20.6). Поджелудочная железа формируется при слиянии дорсального и вентрального дивертикулов. В процессе роста они сближаются и в итоге срастаются. У человека сохраняется только вентральный проток, служащий для доставки пищеварительных ферментов в кишечник. У других видов (например, у собак) и дорсальный, и вентральный проток впадают в кишечник.

Энтодерма задней кишки содержит клетки-предшественники, способные образовывать поджелудочную железу, печень и желчный пузырь. Существует тесная взаимосвязь спланхнической мезодермы боковой пластинки и энтодермы передней кишки. Так же как энтодерма передней кишки строго необходима при спецификации кардиогенной мезодермы, мезодерма (особенно эндотелиальные клетки кровеносных сосудов) стимулирует образование зачатка печени и поджелудочной железы в энтодермальной трубке.

Хроматин мультисигнальных стволовых клеток энтодермы вентральной передней кишки может быть подготовлен для активации их дифференцировки. Гены, участвующие в формировании клеток-предшественников печени, подвергаются сайленсингу иначе, чем гены, ответственные за образование клеток-предшественников поджелудочной железы. Таким образом, один сигнал может разблокировать целую группу генов спецификации (Xu et al., 2011; Zaret, 2016).

ФОРМИРОВАНИЕ ПЕЧЕНИ

Экспрессия специфичных для печени генов (например, генов α -фетопротейна и альбумина) может происходить в любой области кишечной трубки, которая подвергается воздействию кардиогенной мезодермы.

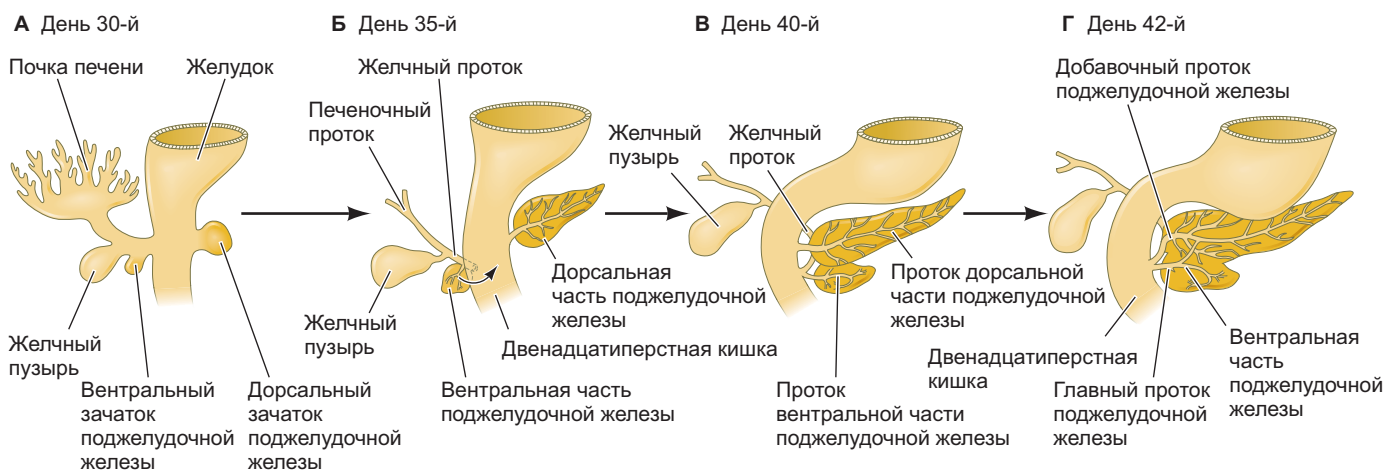


Рис. 20.6. Развитие поджелудочной железы у человека. **А.** На 30-й день вентральный зачаток поджелудочной железы находится близко к зачатку печени. **Б.** На 35-й день он начинает мигрировать назад и (**В**) вступает в контакт с дорсальным зачатком поджелудочной железы в течение шестой недели развития. **Г.** У большинства людей дорсальный дивертикул поджелудочной железы теряет проток, открывавшийся в двенадцатиперстную кишку, однако примерно у 10% населения сохраняется система двойных протоков. (По данным: T. W. Sadler, 2018. *Langman's Medical Embryology*. Wolters Kluwer Health: Philadelphia.)

Тем не менее эта индукция произойдет, только если удалена хорда. Если хорда примыкает к той части энтодермы, которую обычно индуцирует кардиогенная мезодерма и которая образует печень, то энтодерма не образует паренхиму печени. Таким образом, развивающееся сердце, по-видимому, стимулирует формирование печени, в то время как присутствие хорды его подавляет (**рис. 20.7**). Такая индукция может быть связана с факторами FGF, которые секретируют развивающиеся сердечные и эндотелиальные клетки (Le Douarin, 1975; Gualdi et al., 1996; Jung et al., 1999; Matsumoto et al., 2001). Сигналы BMP (и, возможно, Wnt), исходящие от мезодермы боковой пластинки, тоже необходимы для формирования печени (Zhang et al., 2004; Ober et al., 2006). Таким образом, серд-

це и эндотелиальные клетки выполняют связанную с развитием функцию в дополнение к своей роли в кровообращении: помогают индуцировать образование зачатка печени, секретируя паракринные факторы.

Однако, чтобы ответить на сигнал FGF, энтодерма должна стать компетентной.

Компетентность придают энтодерме передней кишки факторы транскрипции Forkhead (Foxa1 и Foxa2), которые декомпактизируют хроматин, окружающий специфичные для печени гены. При отсутствии экспрессии транскрипционных факторов Forkhead в энтодерме эмбрионов мыши не формируется печень (Lee et al., 2005; Hirai et al., 2010; Parviz et al., 2003).

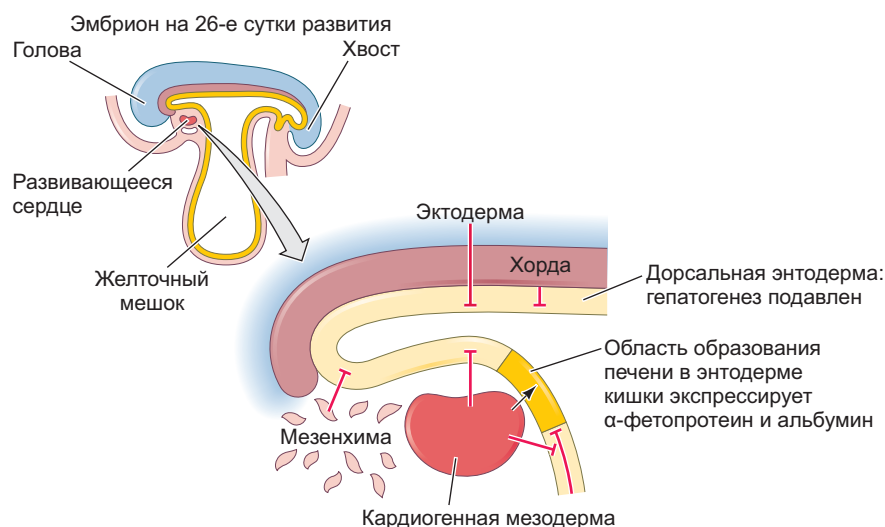


Рис. 20.7. Положительные и отрицательные сигналы в формировании печеночной энтодермы мыши. Эктодерма и хорда блокируют способность энтодермы экспрессировать специфичные для печени гены. Кардиогенная мезодерма, вероятно, через Fgf1 или Fgf2, способствует специфичной для печени транскрипции генов, блокируя ингибирующие факторы, индуцируемые окружающей тканью. (По данным: R. Gualdi et al., 1996. *Genes Dev* 10: 1670–1682.)

На более поздних этапах развития другие факторы транскрипции семейства Forkhead, например HNF4 α , становятся критически необходимыми для морфологической и биохимической дифференцировки зачатка печени в печеночную паренхиму (Parviz et al., 2003).

ФОРМИРОВАНИЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Образование поджелудочной железы происходит зеркально формированию печени. С одной стороны, клетки сердца способствуют развитию, а хорда подавляет образование печени, с другой стороны, хорда может активно способствовать формированию поджелудочной железы, а кардиомиоциты — препятствовать этому. По всей видимости, один и тот же участок пищеварительного тракта обладает возможностью образования либо поджелудочной железы, либо печени. Одно сочетание факторов (наличие сердца, отсутствие хорды) индуцирует формирование печени, тогда как противоположные условия (наличие хорды, отсутствие сердца) вызывают образование поджелудочной железы.

Хорда активирует развитие поджелудочной железы, подавляя экспрессию *Shh* в энтодерме (Apelqvist et al., 1997; Hebrok et al., 1998). (Это удивительное открытие, так как хорда — источник белка Shh и индуктор дальнейшей экспрессии гена *Shh* в эктодермальных тканях.) Sonic hedgehog экспрессируется по всей энтодерме кишечника, за исключением области, из которой будет образована поджелудочная

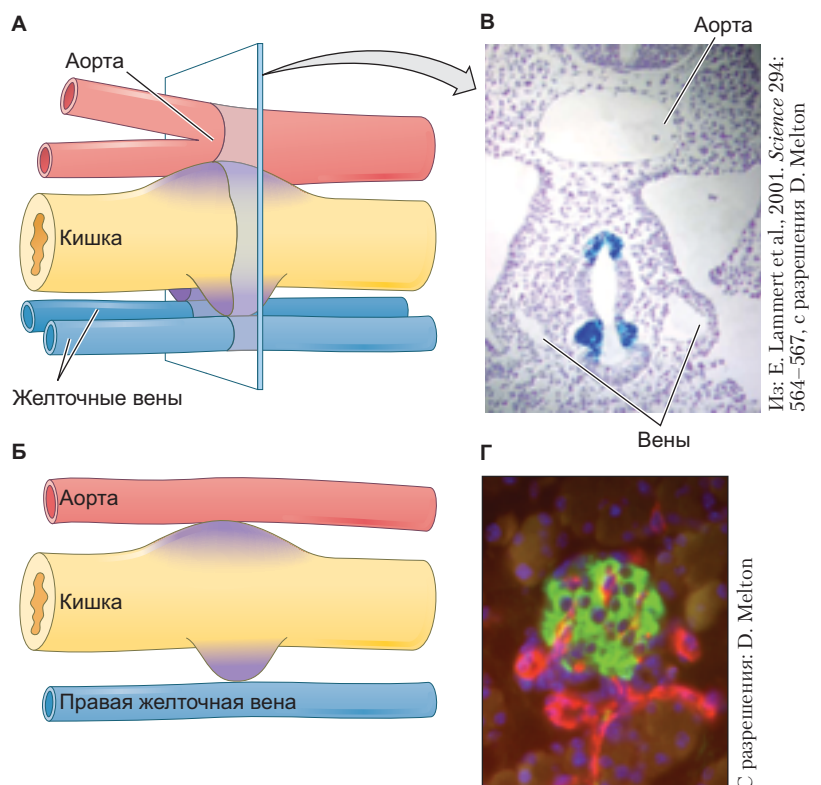
железа. Хорда секретирует Fgf2 и активин, способные подавлять экспрессию *Shh*. Если в этой зоне экспериментально вызвать экспрессию *Shh*, ткань снова становится кишечной (Jonsson et al., 1994; Ahlgren et al., 1996; Offield et al., 1996).

Отсутствие Shh в зоне кишки, формирующей поджелудочную железу, по-видимому, позволяет этой области реагировать на сигналы, поступающие из эндотелия кровеносных сосудов. Действительно, развитие поджелудочной железы начинается именно в тех трех точках, где энтодерма передней кишки контактирует с эндотелием основных кровеносных сосудов. Именно в тех точках, где энтодермальная трубка встречается с аортой и желтковыми венами, экспрессируются факторы транскрипции Pdx1 и Ptf1a (рис. 20.8А–В; Lammert et al., 2001; Yoshitomi and Zaret, 2004). Если кровеносные сосуды удалить из этой области, не образуются и зоны, экспрессирующие *Pdx1* и *Ptf1a*, следовательно не формируется и энтодерма поджелудочной железы. Если в этой области образуется больше кровеносных сосудов, большая часть энтодермальной трубки будет давать ткани поджелудочной железы.

ОБРАЗОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ В-КЛЕТОК

Преобразование или замена отсутствующих или поврежденных клеток новыми функциональными клетками — одно из важнейших практических применений достижений биологии развития в медицине. В гл. 5

Рис. 20.8. Индукция экспрессии гена *Pdx1* в эпителии кишечника. **А.** У эмбрионов курицы *Pdx1* (окрашен фиолетовым) экспрессируется в кишечной трубке вследствие контакта с аортой и желтковыми венами. В областях экспрессии гена *Pdx1* образуются дорсальные и вентральные зачатки поджелудочной железы. **Б.** У эмбриона мыши сохраняется только правая желточная вена, впоследствии она контактирует с эндотелием кишечника. Экспрессия гена *Pdx1* наблюдается только на этой стороне, появляется только один вентральный зачаток поджелудочной железы. **В.** Гибридизация *in situ* мРНК гена *Pdx1* на срезе области контакта между кровеносными сосудами и кишечной трубкой эмбриона мыши. Области экспрессии *Pdx1* показаны темно-синим цветом. **Г.** Кровеносные сосуды (окрашенные в красный цвет) направляют клетки островков (окрашенные в зеленый цвет с антителами к инсулину) на дифференцировку в куриных эмбрионах. Ядра окрашены в темно-синий цвет. (Рис. А–В по данным E. Lammert et al., 2001. *Science* 294: 564–567, любезно предоставлено D. Melton.)



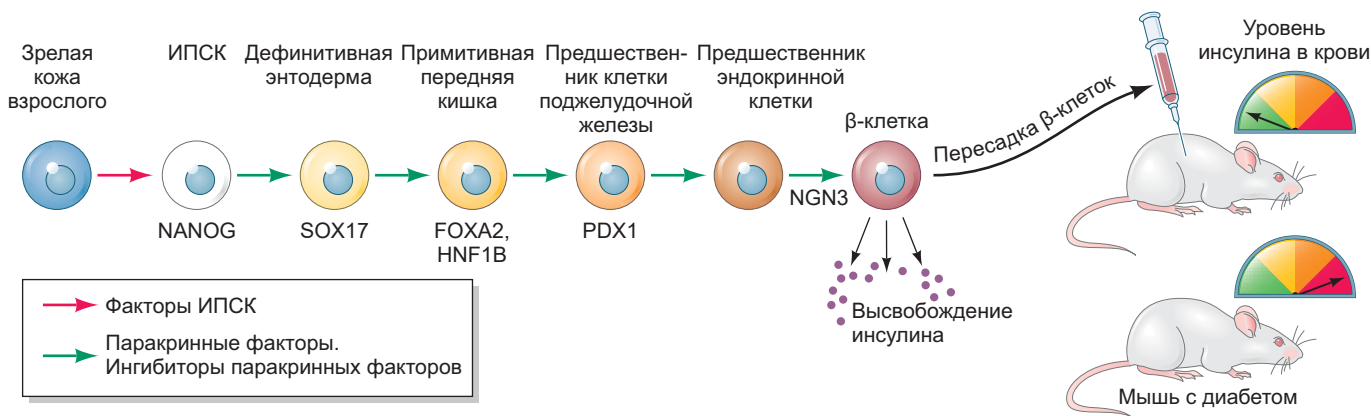


Рис. 20.9. Получение функциональных, секретирующих инсулин, β -клеток из постнатальных клеток. Клетки кожи взрослого человека превращают в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) с помощью факторов транскрипции, упомянутых в главе 5. ИПСК может стать практически любой клеткой эмбриона. Чтобы превратить ИПСК в β -клетку поджелудочной железы, ученые последовательно имитировали условия, наблюдаемые в эмбриональном развитии. Необходимо было обеспечить их определенными паракаринными факторами и ингибиторами паракаринных факторов. ИПСК стали первым типом клеток, получившим паттерн транскрипционных факторов примитивной энтодермы. Впоследствии они стали сначала подобными клеткам передней кишки, затем — клеткам поджелудочной железы, эндокринным клеткам поджелудочной железы и, наконец (после некоторых промежуточных этапов, не показанных здесь), окончательно стали β -клетками поджелудочной железы. Эти β -клетки могут быть перенесены в организм мыши, где они станут регулировать уровень глюкозы, и, таким образом, их можно будет применять для лечения мышинной модели диабета. (Из: F. W. Pagliuca et al. 2014. *Cell* 159: 428–439; A. Rezaei et al. 2014. *Nat Biotechnol* 32: 1121–1133.)

мы говорили об индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК). Клетки кожи человека могут быть превращены в плюрипотентные стволовые клетки путем активации определенных транскрипционных факторов, возвращающих взрослую клетку в состояние, подобное (а возможно, и идентичное) состоянию эмбриональных стволовых клеток внутренней клеточной массы. Паракаринные факторы, добавленные в определенный момент в нужных количествах, могут повторить *in vitro* состояние эмбриона и вызвать дифференцировку ИПСК в конкретный тип клеток. В 2014 г. в двух лабораториях подобрали правильную последовательность условий, вызывающую образование функциональных, секретирующих инсулин панкреатических β -клеток (Pagliuca et al., 2014; Rezaei et al., 2014). Эти β -клетки были способны вылечить диабет у мышей (**рис. 20.9**).

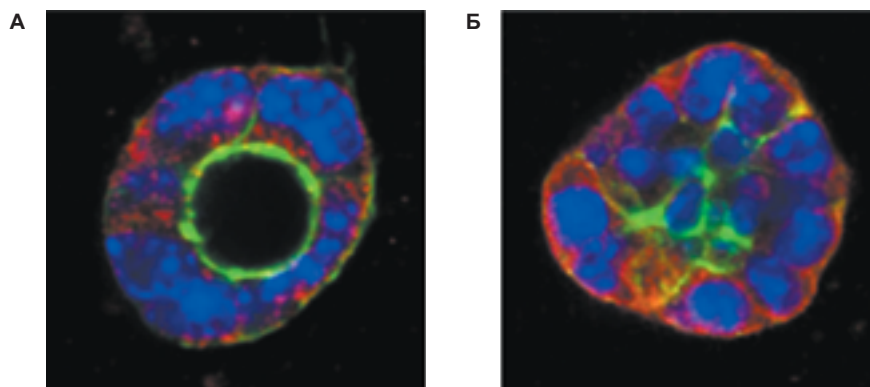
ЖЕЛЧНЫЙ ПУЗЫРЬ

Происхождение желчного пузыря плохо изучено. Картирование презумптивных судеб энтодермы, из которой образуется желчный пузырь мыши, было выполнено только в 2015 г. Оно показало, что большинство предшественников желчного пузыря были расположены в латеральной области энтодермы передней кишки, на уровне между первым и вторым сомитом (Uemura et al., 2015).

Одно интересное замечание о развитии желчного пузыря заключается в том, что некоторые млекопитающие (в том числе некоторые младенцы человека) рождаются с атрезией желчевыводящих путей, при которой блокируются протоки желчного пузыря. Никто не знает, почему это происходит. Тем не менее вспышка атрезии желчевыводящих протоков у австралийского скота привлекла внимание к этому заболеванию. Международная группа ученых пришла к выводу, что в определенный момент продолжительная засуха вызвала широкое распространение использования дисфании в качестве корма и что это растение содержало тератогенный токсин билиатрезон, который специфически препятствовал развитию желчного пузыря (**рис. 20.10**). Проверка тысячи соединений на рыбках *Danio* (это относительно дешево по сравнению с другими организмами), ученые обнаружили, что определенное соединение перекрывает развивающиеся желчные протоки. Так как данное исследование показало, что это вещество может вызывать атрезию, в настоящее время биологи ищут его в других растениях.

Дыхательная трубка

Легкие являются производными пищеварительной трубки, несмотря на то что они не играют никакой роли в пищеварении. По центру дна глотки, на уровне



Из: K. Lorent et al., 2015.
Science Transl Med 7: 286ra67,
 с разрешения M. Pack

Рис. 20.10. Атрезия желчевыводящих путей, вызванная веществом растительного происхождения. **А.** Клетки желчного пузыря в 3D-культуре образуют сферы с открытым просветом, напоминающие нормальные желчные протоки. **Б.** У мышей, получавших тератогенное соединение билиатрезон (из растения дисфании), полярность клеток изменяется и просвет закрывается

не четвертой пары глоточных карманов, вентрально пролегает **ларинготрахеальный желоб** (бороздка) (рис. 20.11А–В). Впоследствии бороздка разделяется на две ветви, которые образуют парные бронхи и легкие. Энтодерма гортани и трахеи становится слизистой оболочкой трахеи и двух бронхов, а также воздушных мешочков (альвеол) легких. Иногда разделение оказывается неполным и ребенок рождается со сросшимися кишечной и дыхательной трубками. Это состояние называют **трахеопищеводным свищом**, и необходимо хирургическое восстановление, чтобы ребенок мог нормально дышать и глотать.

Отделение трахеи от пищевода является еще одним примером взаимодействия энтодермы и мезенхимы. На этом более позднем этапе развития присутствует различие между дорсальной и вентральной областями тела. Сигналы Wnt от мезенхимы вызывают накопление β -катенина в области кишечной трубки, которая впоследствии образует легкие и трахею. Без сигналов разделение кишечной и трахеальной трубок не происходит и трахея не развивается (Goss et al., 2009). И наоборот, если β -катенин эктопически экспрессируется в кишечной трубке, могут образовываться дополнительные легкие (Harris-Johnson et al., 2009).

Дорсальная часть дыхательной трубки остается в контакте с мезенхимой, которая содержит транскрипционный фактор *Barx1* и продуцирует ингибирующие Wnt растворимые Frizzled-связанные белки (soluble Frizzled-related proteins, sFRP; аналогично *Frzb*, см. гл. 11). Эти белки могут связываться с Wnt-белками и препятствовать их контакту с рецепторами клеточной мембраны, таким образом блокируя активность Wnt и способствуя дифференцировке эпителия пищевода. Однако вентральная часть дыхательной трубки вступает в контакт с мезенхимой, которая не продуцирует sFRP. Здесь

активные сигналы Wnt способствуют превращению трубки в респираторный реснитчатый эпителий трахеи (рис. 20.11Г; Woo et al., 2011).



Загадки развития

Когда ребенок рождается преждевременно, клетки его легких часто недифференцированы. Что могут сделать врачи для того, чтобы ускорить развитие легких?

Эпителио-мезенхимные взаимодействия и биомеханика ветвления в легких

Как и в случае с кишкой, зональная спецификация мезенхимы определяет дальнейшую дифференцировку развивающейся дыхательной трубки. У зародыша млекопитающего респираторный эпителий отрастает в область шеи, образуя трахею. После попадания в грудную клетку он разветвляется, образуя два бронха, а затем и легкие. Дыхательный эпителий эмбриона мыши можно выделить сразу, после того как он разделился на два бронха, и экспериментально по-разному воздействовать на обе стороны. На рис. 20.11Д представлен случай, когда для эпителия правого бронха сохранили мезенхиму образующегося легкого, в то время как к левому бронху подсаживали мезенхиму трахеи (Wessells, 1970). Правый бронх пролиферировал и давал ответвления под влиянием мезенхимы легкого, тогда как левый бронх продолжал расти неразветвленным. Важно заметить, что дифференцировка респираторного эпителия в клетки трахеи или клетки легких зависит от мезенхимы, с которой он контактирует (Shannon et al., 1998).

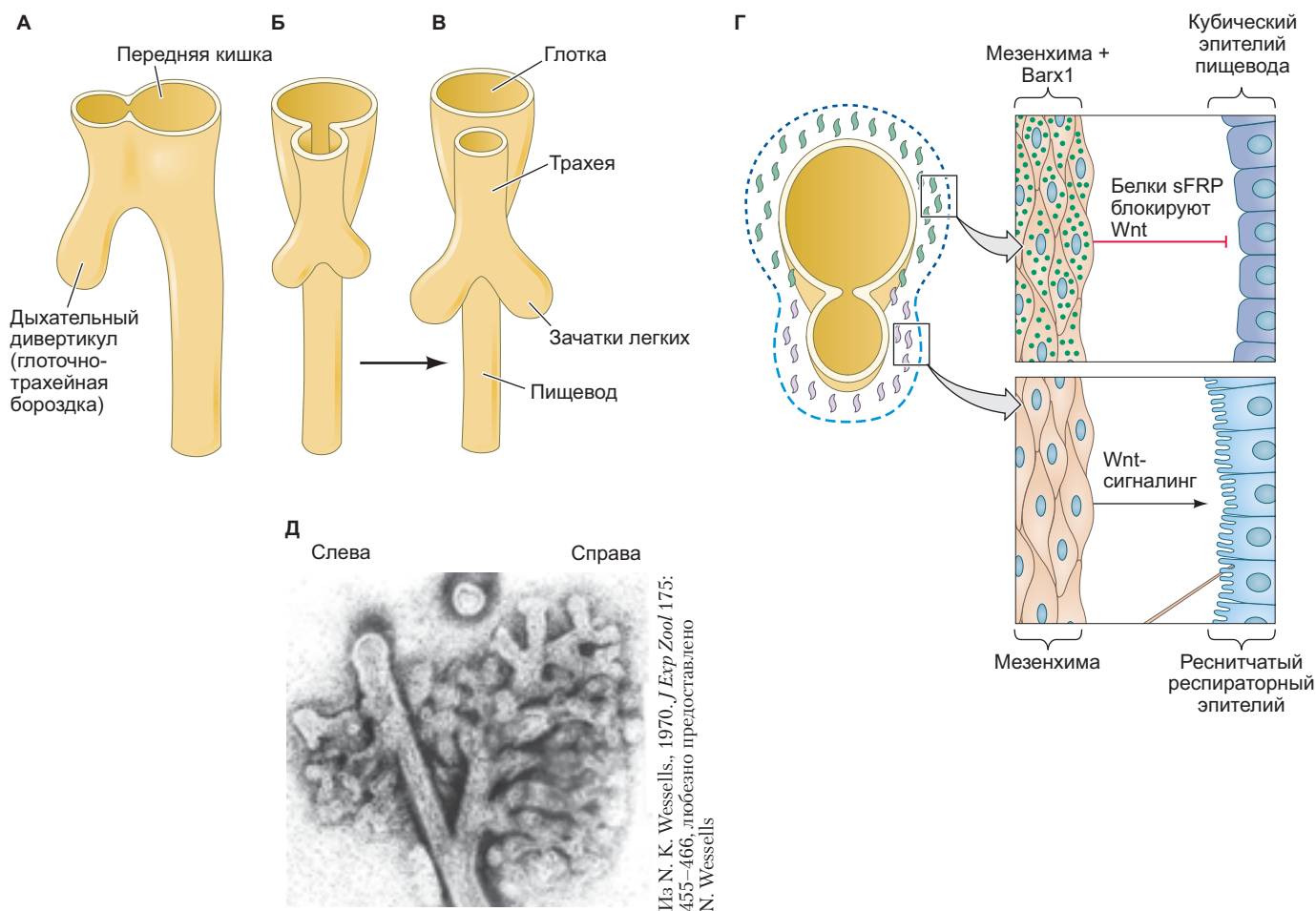


Рис. 20.11. Разделение передней кишки на пищевод и дыхательный дивертикул в течение третьей и четвертой недель беременности человека. **А, Б.** Вид сбоку и с вентральной стороны, конец третьей недели. **В.** Вид сбоку, четвертая неделя. **Г.** Модель роли Wnt-сигналинга и мезенхимы, экспрессирующей *Barx1*, в дифференцировке пищевода и трахеи. Отсутствие белка *Barx1* и экспрессия компонентов Wnt-сигналинга вызывают экспрессию *Nkx2-1* и дифференцировку дыхательного эпителия. Когда присутствует *Barx1*, Wnt-сигналинг блокируется и происходит транскрипция фактора *Sox2*, что способствует формированию области пищевода. **Д.** После того как эпителий легких в эмбрионе мыши разветвился на два бронха, весь зачаток вырезали и культивировали отдельно. Верхний левый бронх был покрыт мезенхимой трахеи, а правый бронх оставался нетронутым. В итоге конец правого бронха образовывал ответвления, характерные для легкого, тогда как в левом бронхе ветвления почти не было. (Рис. А–В по данным T. W. Sadler, 2018. *Langman's Medical Embryology*. Wolters Kluwer Health: Philadelphia; Рис. Г. по данным J. Woo et al., 2011. *PLOS One* 6: e22493.)

Можно подумать, что сложная трехмерная схема ветвления легких млекопитающих развивается случайным образом (рис. 20.12А). К удивлению многих, древовидный узор ветвления легкого является стереотипным и следует трем принципам геометрических вариантов ветвления: доменное ветвление, планарная бифуркация и ортогональная бифуркация (Metzger et al., 2008). Подобно зубцам скрученного гребня, доменное ветвление образует ряды или домены последовательных выростов (долей) вдоль проксимальной или дистальной оси исходной эпителиальной трубки (рис. 20.12Б). В определенных местах новые ряды ветвей растут из смещенного по окру-

ности положения вокруг дорсальной, вентральной, медиальной или латеральной стороны бронха (как в скрученном гребне). Дальнейшее ветвление может происходить путем *планарной бифуркации* так, что концы каждой доли данной ветви расщепляются по их средней линии, причем каждая повторяющаяся точка ветвления происходит вдоль одной и той же антерио-постериорной плоскости. Более поздно формирующиеся ветви аналогично раздваиваются на своих концах, но в большинстве случаев происходит поворот на 90° между каждой новой ветвью для создания узора из чередующихся перпендикулярно расположенных точек ветвления, что называют *орто-*

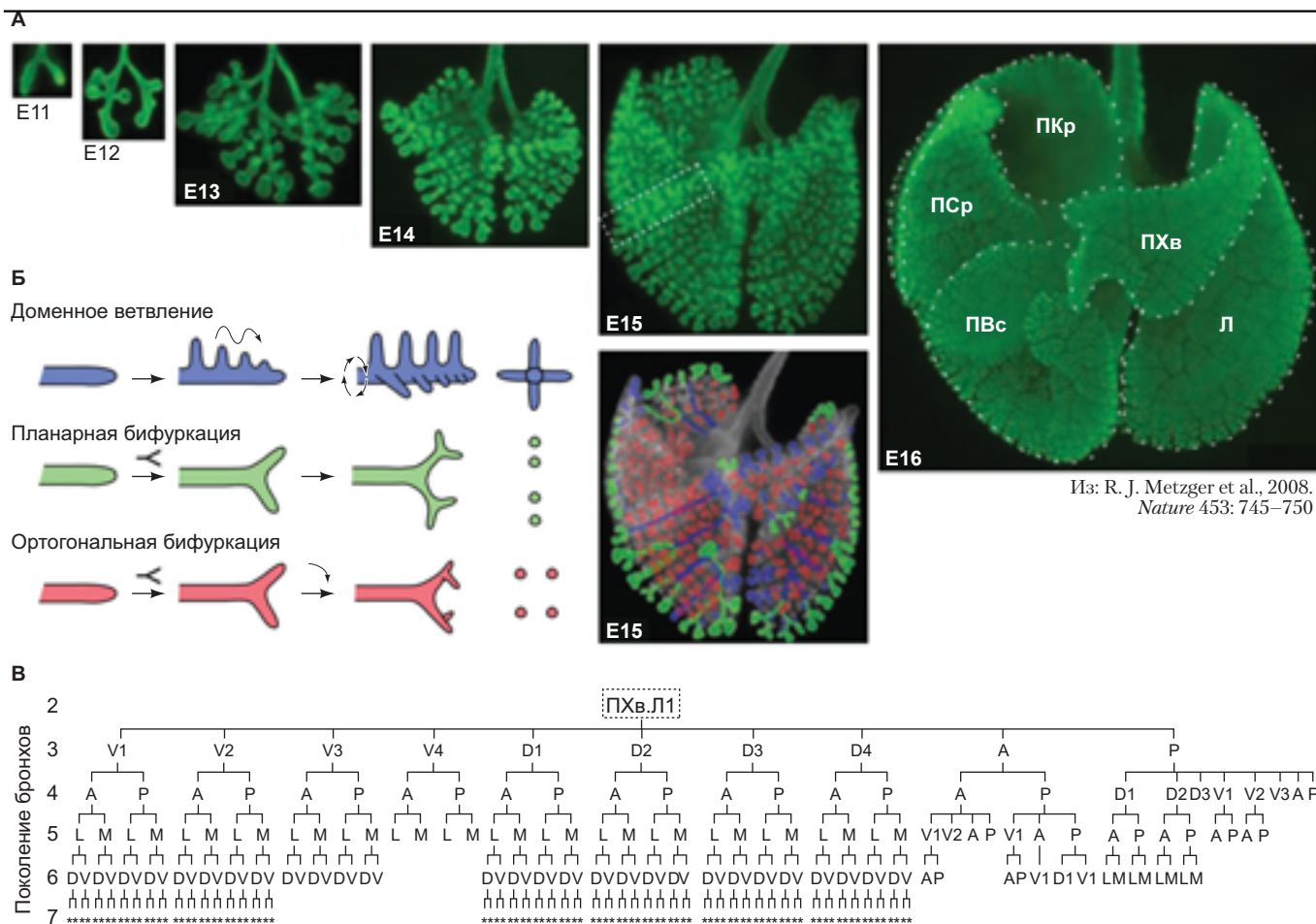


Рис. 20.12. Морфогенез ветвей в бронхиальном эпителии мыши. **А.** Вид с вентральной стороны на легкие мыши на разных сроках эмбрионального развития (в эмбриональных сутках, Е); визуализация с помощью метки антител к белку E-cadherin. Масштабная линейка 500 мкм. Каждая доля легкого на E16 четко различается: правая краниальная часть (ПКр), правая средняя (ПСр), вспомогательная (ПВс), правая хвостовая (ПХв) и левая (Л) доли. **Б.** Три различных типа ветвления эпителия бронхов. Псевдоцветами на изображении E15 справа показаны доли, которые формируются разными способами. **В.** Древо родословной для каждой ветви правой хвостовой (ПХв), латеральной 1 (Л1) доли (в рамке на рис. А). Ориентация каждой ветви относительно ее основных бронхов была нанесена на карту, будь то anteriорная (А), дорсальная (D), латеральная (L), медиальная (M), постериорная (P), вентральная (V) или переменная (*) по отношению к своей родительской ветке. (Рис. Б и В по данным: R. J. Metzger et al., 2008. *Nature* 453: 745–750.)

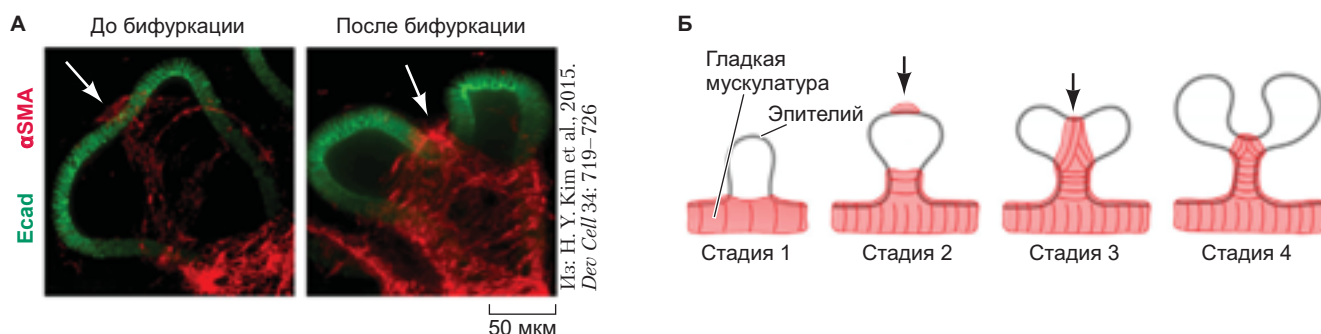


Рис. 20.13. Гладкая мускулатура может вызвать ветвление легкого мыши. **А.** Локальная дифференцировка гладких мышц (α SMA; красный) в предполагаемой расщелине эпителия легкого (зеленый, мечение E-cadherin), а также после бифуркационного ветвления (указано стрелками). **Б.** Последовательность взаимодействия гладких мышц и эпителия легких при бифуркации. (Рис. Б из: H. Y. Kim et al., 2015. *Dev Cell* 34: 719–726.)

гональной бифуркацией. Примечательно, что эти три различных способа применяются с такой точностью во время морфогенеза легких, что происхождение каждой альвеолы можно проследить до исходного бронха (рис. 20.12B; Metzger et al., 2008).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Одно и то же ветвление образуется с применением разных сил

«Подъехав к развилке на дороге, следуйте по ней». Эта комичная цитата покойного Йоги Берры оказывается действительно мудрой, когда речь идет о развитии легких. Похоже, что мышь и цыпленок решили пойти разными путями, столкнувшись с развилкой. В легких млекопитающих дифференцировка гладкой мускулатуры необходима для формирования мезенхимы дистального конца отрастающей ветви. Гладкая мышца вызывает возникновение расщелины внутри ветви, которая вскоре соединяется с окружающими гладкомышечными клетками вокруг проксимальных областей ветви (рис. 20.13; Спурлин и Нельсон, 2017; Ким и др., 2015). Фармакологическое нарушение дифференцировки подавляет ветвление на конце. Это позволяет предположить, что сокращение гладких мышц, локализованных на кончике ветви, способствует бифуркации ветви у мыши. В дыхательных путях птицы точки ветвления строятся из родительской ветви, вызывая локализованное апикальное сокращение, которое заставляет формировать новый зачаток (рис. 20.14; Kim et al., 2013; Spurlin and Nelson, 2017). Важно отметить, что в обоих случаях

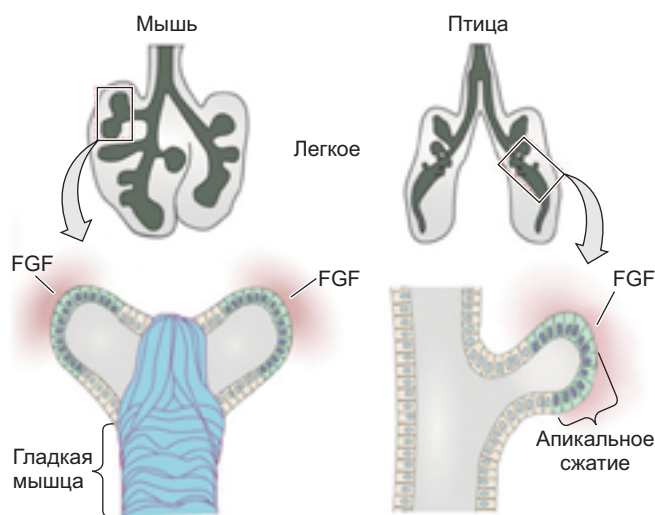
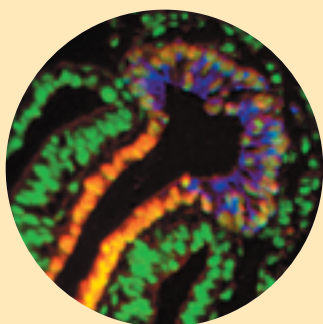


Рис. 20.14. Дыхательные пути млекопитающих и птиц образуют ветвление с помощью различных механизмов. У мыши происходит сокращение гладких мышц для создания бифуркации в зачатке, в то время как у цыпленка существует механизм апикального сокращения, вызывающий новые точки ветвления. В местах нарастания действуют сигнальные мезенхимы, опосредованные членами семейства FGF, необходимыми для биомеханических процессов морфогенеза ветвей как у мышей, так и у птиц. (Из: J. W. Spurlin and C. M. Nelson, 2017. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372: 20150527.)

разрастание и ветвление почек легочного эпителия развивается в ответ на очаговую экспрессию факторов FGF в смежной мезенхиме (рис. 20.14).



С разрешения: Ken S. Zaret

О фотографии в начале главы

В этом девятидневном эмбрионе мыши можно увидеть зачаток печени. Ядра окрашены в зеленый цвет, а клетки-предшественники кишечника окрашены в оранжевый цвет с антителом к фактору транскрипции FoxA2. Окрашенные в синий цвет клетки являются гепатобластами и станут печенью; они экспрессируют гомеодоменсодержащий транскрипционный фактор Hnf1b, который изменяет структуру эпителиальных клеток и позволяет им пролиферировать в мезенхиме.



Коротко Энтодерма

1. Транскрипционный фактор *Sox17* имеет решающее значение для спецификации энтодермы. У позвоночных энтодерма образует пищеварительную (кишечную) и дыхательную трубки.
2. Кишечная трубка разделена на три области градиентом белков Wnt, BMP и FGF вдоль ее антериопостериорной оси. Энтодерма в задней части (средняя и задняя кишка) становится скоплением клеток-предшественников, образующих кишечник. Энтодерма около головы будет образовывать клетки передней кишки, которые порождают клетки-предшественники легких и щитовидной железы. Область между ними становится клетками-предшественниками задней кишки, которые дают поджелудочную железу, желчный пузырь и печень.
3. Четыре пары глоточных карманов становятся энтодермальной оболочкой евстахиевых труб, миндалин, тимуса и околощитовидных желез. Щитовидная железа тоже формируется в этой области энтодермы.
4. Кишечные ткани образуются в результате взаимодействия энтодермы и мезодермы. Сигналы Wnt от мезодермы и Sonic hedgehog от энтодермы, по-видимому, играют роль в индукции вложенного паттерна экспрессии *Нох*-гена в мезодерме, окружающей кишку. Затем размеченная мезодерма инструктирует энтодермальную трубку формировать различные органы пищеварительного тракта.
5. Два основных типа клеток печени — гепатоциты, регулирующие обмен веществ в организме, и холангиоциты, выстилающие протоки.
6. Энтодерма помогает специфицировать висцеральную мезодерму; висцеральная мезодерма, особенно сердце и кровеносные сосуды, в свою очередь специфицирует энтодерму.
7. Поджелудочная железа формируется в области энтодермы, в которой отсутствует экспрессия *Shh*. В этой области экспрессируются транскрипционные факторы *Pdx1* и *Ptf1a*.
8. При создании условий, схожих с эмбриональными, человеческие ИПСК могут превращаться в предшественников панкреатических β -клеток и дифференцироваться в клетки, секретирующие инсулин.
9. Дыхательная трубка является отростком кишки. Зональная специфичность мезенхимы, с которой она встречается, определяет, останется трубка прямой (как в трахее) или будет ветвиться (как в бронхах и альвеолах).
10. В развивающемся легком существует три способа морфогенеза ветвления: доменное ветвление, планарная бифуркация и ортогональная бифуркация. Развитие ветвления бронхов контролируют биомеханические силы, создаваемые сокращением гладких мышц (у мыши) или апикальным сокращением клеток (у птиц).

Метаморфоз:

гормональная реактивация развития

Как питание личинки помогает выживанию взрослой формы?



© The Natural History Museum/Alamy Stock Photo

Мало какие события в развитии животных сопоставимы по зрелищности с **метаморфозом** — явлением гормональной реактивации развития, придающим телу животного новую форму. Про животных (включая людей), чья молодь представляет собой фактически маленькие сексуально незрелые версии взрослых, говорят, что у них **прямое развитие**. В то же время большинство видов животных обладают **непрямым развитием**: их жизненный цикл включает личностную стадию, разительно отличающуюся от взрослого организма, который формируется только после периода метаморфоза.

Метаморфоз является экологическим переходом и переходом в развитии. Очень часто личиночные формы специализируются на какой-либо функции, например, роста или расселения, в то время как взрослая форма специализируется на размножении. Так, мотылек *Cecropia* вылупляется из яйца и развивается в бескрылую ювенильную особь гусеницу в течение нескольких месяцев. После метаморфоза взрослые насекомые проводят в своей полностью развитой крылатой форме всего около дня и должны быстро спариться перед смертью. Взрослые мотыльки никогда не питаются; более того, в этой короткой репродуктивной фазе жизненного цикла у них даже нет ротового аппарата. Метаморфоз запускают особые гормоны, которые повторно активируют процессы развития во всем организме, изменяя морфологию, физиологию и поведение, чтобы подготовить его к новому режиму существования. С экологической точки зрения метаморфоз связан со сменой местобитания, питания и поведения (Jacobs et al., 2006).

Среди организмов с непрямым развитием встречается два основных типа личинок. Личинки, радикально отличающиеся от взрослой формы по плану строения и морфологически, называют **первичными личинками**. К примеру, личинки морского ежа

ТАБЛИЦА 21.1. Некоторые изменения в ходе метаморфоза амфибий

Система	Личинка	Взрослая форма
Двигательная	Водного типа; есть хвостовой плавник	Наземного типа; бесхвостые четвероногие
Дыхательная	Жабры, кожа, легкие; личиночные гемоглобины	Кожа, легкие; взрослые варианты гемоглобинов
Кровеносная	Дуги аорты; аорта; передняя, задняя и общая яремные вены	Каротидная дуга; системная дуга; кардинальные вены
Пищеварительная	Травоядные; длинный спиральный кишечник; кишечные симбионты; небольшой рот, роговые челюсти, губные зубы	Плотоядные; короткий кишечник; протеазы; крупный рот с длинным языком
Нервная	Отсутствие мигательной перепонки, порфиросин; система органов боковой линии, нейроны Маутнера	Развитие глазных мышц, мигательная перепонка, барабанная перепонка; родопсин; утрата системы органов боковой линии, дегенерация нейронов Маутнера
Выделительная	Главным образом аммиак, немного мочевины (аммониотелия)	Главным образом мочевины, высокая активность ферментов цикла орнитин-мочевины (уротелия)
Покровная	Тонкий двуслойный эпидермис с тонкой дермой без слизистых и гранулярных желез	Многослойный чешуйчатый эпидермис со зрелыми вариантами кератинов; хорошо развитая дерма содержит слизистые и гранулярные железы, секретирующие антибактериальные белки

Источник: C. Turner and J. T. Bagnara, 1976. General Endocrinology. Saunders: Philadelphia; D. S. Reilly et al., 1994. Dev Biol 162: 123–133.

представляют собой билатерально симметричные организмы, парящие в открытом море в составе планктона и питающиеся там же. В то же время взрослые морские ежи обладают пятилучевой симметрией и питаются, соскребая водоросли с камней на морском дне. В плане строения личинки не просматривается и следа взрослой формы¹.

Вторичными личинками называют личинки, имеющие общий план строения со взрослой формой. Так, несмотря на очевидные различия между гусеницей и бабочкой, обе стадии жизни сохраняют одни и те же оси тела и развиваются путем удаления или изменения старых частей, а также добавления новых структур в существующую основу. Головастики лягушки, несмотря на специализацию для жизни в водной среде, тоже является вторичной личинкой, организованной таким же образом, что впоследствии взрослая особь (Jagersten, 1972; Raff and Raff, 2009).

Метаморфоз — одно из наиболее поразительных явлений развития, и происходящие в это время у некоторых видов всесторонние морфологические изменения захватывали анатомов развития веками (Merian, 1705; Swammerdam, 1737). Однако молекулярные основы метаморфоза известны нам лишь в общих чертах и только для «горстки» видов.

¹ На этот счет существуют разногласия, но личинки, вероятно, эволюционировали после установления взрослой формы. Другими словами, животные эволюционировали через прямое развитие, а личиночные формы появились как специализация для питания и распространения в ранний период жизненного цикла (Jenner, 2000; Rouse, 2000; Raff and Raff, 2009). Более того, двухфазный жизненный цикл можно рассматривать как характерную черту многоклеточных животных (Degnan and Degnan, 2010).

Метаморфоз у амфибий

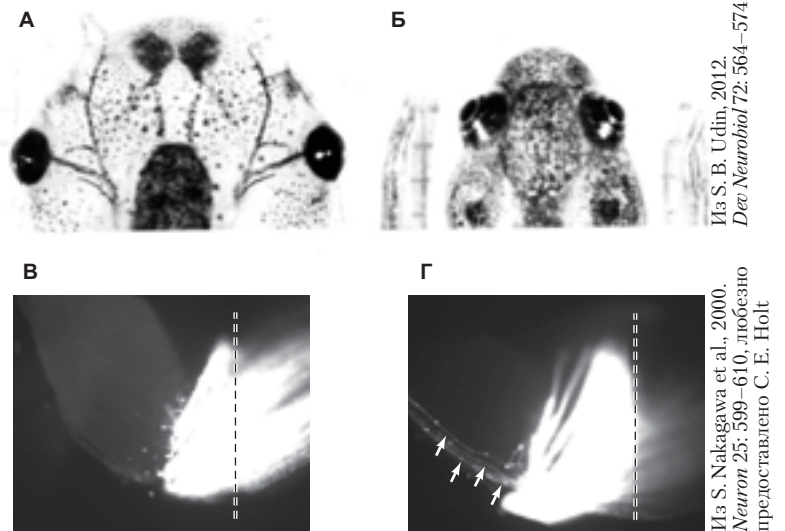
Само название амфибий отражает способность претерпевать метаморфоз и происходит от греческих корней *amphi* (двойной) и *bios* (жизнь). Их метаморфоз связан с морфологическими изменениями, готовящими водный организм к преимущественно наземному существованию. У **хвостатых** амфибий (саламандр) эти изменения включают резорбцию хвостового плавника, разрушение внешних жабр и изменение структуры кожи. У **бесхвостых** амфибий (лягушек и жаб) изменения более радикальны, модификации подвергается почти каждый орган (**табл. 21.1**; см. также рис. 1.7). Изменения в ходе метаморфоза амфибий запускают тиреоидные гормоны тироксин (T_4) и трийодтиронин (T_3), которые с кровью разносятся ко всем органам личинки. Органы личинки в ответ на действие тиреоидных гормонов могут пойти по одному из четырех путей: роста (как задние конечности лягушки), гибели (как хвост), ремоделирования (как кишечник) или смены спецификации (как печень в отношении синтеза ферментов).

Морфологические изменения, связанные с метаморфозом амфибий

РОСТ НОВЫХ СТРУКТУР

Гормон трийодтиронин запускает формирование определенных органов, характерных для взрослых организмов. Как было показано в гл. 1, из определенных участков головастика в ходе метаморфоза возникают конечности взрослой лягушки. Схожим образом

Рис. 21.1. Миграция глаз и связанные с ней изменения нейронов во время метаморфоза у головастика *Xenopus laevis*. **А.** Глаза головастика расположены по бокам, т. е. поле бинокулярного зрения относительно небольшое. **Б.** Во время метаморфоза глаза мигрируют в дорсальном направлении и вперед, создавая у взрослой лягушки обширное поле бинокулярного зрения. **В, Г.** Проекция сетчатки головастика в ходе метаморфоза. Краситель DiI поместили на обрезанный зрительный нерв, чтобы пометить выходы нейронов сетчатки. В начале и в середине метаморфоза аксоны пересекают среднюю линию (*пунктир*), проходя с одной стороны мозга на другую (**В**). В конце метаморфоза в перекресте зрительных нервов производятся эфрин В и формируются определенные нейроны с инсультальными проекциями (*стрелки*) (**Г**)



Из S. B. Udin, 2012.
Dev Neurobiol 72: 564–574
Из S. Nakagawa et al., 2000.
Neuron 25: 599–610, любезно
предоставлено С. Е. Holt

в глазах возникают веки и мигательная перепонка (так называемое третье веко лягушек). Более того, T_3 вызывает пролиферацию и дифференцировку новых нейронов, которые будут обслуживать эти органы. По мере отрастания конечностей новые нейроны пролиферируют и дифференцируются в спинном мозге. Они посылают аксоны к новообразованным мышцам конечностей (Marsh-Armstrong et al., 2004). Блокирование активности T_3 препятствует образованию этих нейронов и вызывает паралич конечностей.

Одно из очевидных следствий метаморфоза бесхвостых амфибий — передвижение глаз, изначально занимавших боковое положение, на переднюю часть головы (**рис. 21.1А, Б**)¹. Боковые глаза головастика типичны для травоядных, служащих добычей, в то время как расположенные спереди глаза лягушки отражают образ жизни хищника. Лягушке нужно видеть трехмерную картину, чтобы поймать добычу. Для этого она должна приобрести *бинокулярное зрение*, при котором данные от обоих глаз объединяются в мозге (см. рис. 15.35Б). У головастика правый глаз иннервирован левой стороной мозга, и наоборот; ипсилатеральные (т. е. идущие на ту же сторону) проекции нейронов сетчатки отсутствуют. Однако в ходе метаморфоза наряду с контрлатеральными (идущими на противоположную сторону) путями возникают ипсилатеральные, что позволяет сигналам от обоих

глаз достигать одной и той же области в мозге (Currie and Cowan, 1974; Hoskins and Grobstein, 1985).

У *Xenopus* новые пути образуются не через перестройку существующих нейронов, а через образование новых нейронов, дифференцирующихся в ответ на действие тиреоидных гормонов (Hoskins and Grobstein, 1985a, b). Эти аксоны оказываются способными уходить ипсилатерально в результате индукции тиреоидными гормонами эфрина В в перекресте зрительных нервов (Nakagawa et al., 2000). Эфрин В обнаружен в перекресте зрительных нервов и млекопитающих (которые обладают ипсилатеральными проекциями в течение всей жизни), но не в перекресте рыб и птиц (у которых имеются только контрлатеральные проекции). Как мы видели в гл. 15, эфрины могут отталкивать определенные нейроны, способствуя росту их отростков в одном направлении, но не в другом (рис. 21.1В, Г).

КЛЕТОЧНАЯ СМЕРТЬ ВО ВРЕМЯ МЕТАМОРФОЗА

Гормон T_3 может вызывать гибель некоторых специфических личиночных структур. Он вызывает дегенерацию лопастевидного хвоста и жабр, которые важны для движения и дыхания личинки, но не взрослого животного. Очевидно, что мышцы и кожа хвоста головастика умирают, но как это происходит — клетки убивают или в них запускается программа самоубийства? Другими словами, T_3 приказывает клеткам убить самих себя или же приказывает чему-либо еще убить клетки? По последним данным, первую стадию резорбции хвоста вызывает клеточное самоубийство, но от остатков хвоста головастик избавляется иначе. Когда в мышечные клетки головастика был введен доминантно негативный рецептор T_3 (из-за чего они не могли реагировать на T_3), они сохранились, что

¹ Один из наиболее зрелищных примеров движения глаз во время метаморфоза имеет место у плоских рыб, таких как камбала. Изначально глаза камбалы, как и боковые глаза других рыб, находятся на противоположных сторонах лицевой части. Однако во время метаморфоза один из глаз мигрирует через всю голову, пока не встретится с глазом на другой стороне (Hashimoto et al., 2002; Bao et al., 2005). Это позволяет плоским рыбам смотреть вверх, обитая на морском дне.

указывает на существование сигнала к апоптозу, передаваемому T_3 (Nakajima and Yaoita, 2003; Nakajima et al., 2005). Это предположение подтвердилось, когда было показано, что гибель мышечных клеток головастика можно предотвратить блокировкой активности вызывающего апоптоз фермента каспаза-9 (Rowe et al., 2005). Однако позднее в ходе метаморфоза мышцы хвоста поедают макрофаги, возможно, из-за переваривания протеазами внеклеточного матрикса, поддерживающего мышечные клетки.

Гибнут и красные кровяные клетки головастика. В ходе метаморфоза личиночный гемоглобин сменяется взрослым гемоглобином, который связывает кислород медленнее и освобождает его быстрее (McCutcheon, 1936; Riggs, 1951). Красные кровяные клетки с личиночным гемоглобином отличаются по форме от взрослых и выборочно перевариваются макрофагами в печени и селезенке после формирования взрослых эритроцитов (Hasebe et al., 1999).

ПЕРЕСТРОЙКА В ХОДЕ МЕТАМОРФОЗА

У лягушек и жаб часть структур преобразуется и подстраивается под нужды взрослой жизни. Личиночный кишечник с множеством изгибов для переваривания растительной пищи укорачивается для пищеварения хищника. Показано, что клетки взрослого кишечника происходят из работающих клеток личиночного кишечника (а не из отдельной субпопуляции стволовых клеток) (Schrieber et al., 2005). По мере растворения внеклеточного матрикса старого кишечника погибает большая часть его эпителиальных клеток. Выжившие, по-видимому, дедифференцируются и становятся стволовыми клетками кишечника (Stolow and Shi, 1995; Ishizuya-Oka et al., 2001; Fu et al., 2005; Nasabe et al., 2013).

Перестраивается значительная часть нервной системы, так как нейроны растут и иннервируют новые мишени. В то время как одни нейроны (например, в зрительных путях) появляются, другие, к примеру, определенные моторные нейроны челюсти головастика, переключаются с мышц головастика на новообразованные взрослые мышцы (Alley and Barnes, 1983). Третьи, такие как клетки, иннервирующие мышцу языка (которой не было у личинки), «дремлют» на стадии головастика и образуют первые синапсы во время метаморфоза (Grobstein, 1987). Органы боковой линии головастика (позволяющие ему чувствовать движение воды и помогающие слышать) дегенерируют, а уши претерпевают дальнейшую дифференцировку (Fritzsche et al., 1988). Развивается среднее ухо а также барабанная перепонка, характерная для наружного уха лягушек и жаб¹. Таким образом,

нервная система бесхвостых претерпевает обширную перестройку, включающую гибель одних нейронов, появление других и смену специфичности у третьих.

Форма черепа у бесхвостых тоже заметно меняется по мере того как практически все структуры головы перестраиваются (Trueb and Hanken, 1992; Berry et al., 1998). Наиболее очевидным изменением является образование новой кости. Череп головастика представляет собой в основном хрящ, происходящий из нервного гребня, в то время как взрослый череп состоит в основном из кости того же происхождения (рис. 21.2; Gross and Hanken, 2005). По мере образования нижней челюсти взрослой особи Меккелев хрящ удлинняется почти вдвое, а вокруг него образуется кожный скелет. По мере роста Меккелева хряща жаберы и хрящ жаберных дуг (необходимые для дыхания головастика в водной среде) дегенерируют, прочие хрящи основательно перестраиваются. Таким образом, как и в нервной системе, одни скелетные элементы пролиферируют, другие погибают, а некоторые перестраиваются. Механизмы, за счет которых один гормональный сигнал вызывает различные эффекты в разных, но зачастую соседствующих тканях, пока не известны.

Гормональный контроль метаморфоза амфибий

Подчинение метаморфоза тиреоидным гормонам впервые продемонстрировано в 1912 г. когда Д. Ф. Гудернатш (J. F. Gudernatsch) обнаружил, что головастики проходят метаморфоз преждевременно, если накормить их растертой щитовидной железой лошади. Эти данные дополнил Беннет Аллен (Bennet Allen, 1916), обнаружив, что после разрушения зачатка щитовидной железы у ранних головастиков они не приступают к метаморфозу, вырастая вместо этого до гигантских размеров. Дальнейшие исследования показали, что последовательные этапы метаморфоза бесхвостых амфибий регулирует возрастающее количество тиреоидных гормонов (Saxén et al., 1957; Kollros, 1961; Hanken and Hall, 1988). Некоторые события (например, развитие конечностей) происходят рано, пока концентрация тиреоидных гормонов низка; другие (такие как резорбция хвоста и перестройка кишечника) наступают позже, по достижении более высокой концентрации гормонов. Эти наблюдения позволили сформулировать **пороговую модель**, согласно которой разные события метаморфоза запускаются разными концентрациями тиреоидных гормонов. Хотя модель по-прежнему полезна, молекулярные исследования показали, что координация событий метаморфоза во времени сложнее, чем просто увеличение концентрации гормонов.

Связанные с метаморфозом изменения в развитии лягушки обусловлены: 1) выделением гормона тироксина (T_4) из щитовидной железы в кровь;

¹ Во время смены мишеней нейронов головастики на короткий период теряют слух (Boatright-Horowitz and Simmons, 1997).

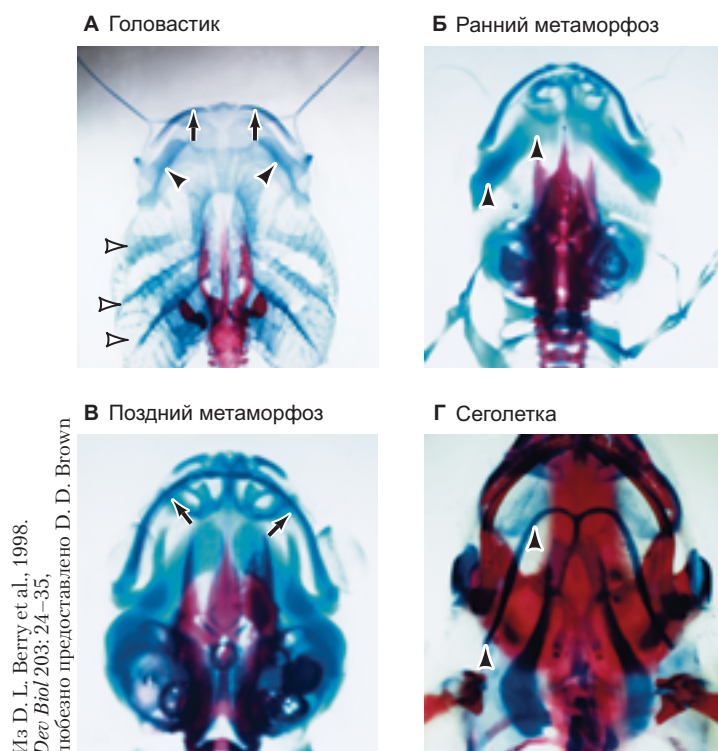


Рис. 21.2. Изменения черепа *Xenopus* в ходе метаморфоза. Целые образцы были окрашены алциановым синим (хрящ) и ализариновым красным (кость). **А.** До метаморфоза хорошо выражены хрящевые жаберные дуги (белые треугольники), Меккелев хрящ находится на краю головы (стрелки), а рогоподъязычный хрящ (черные треугольники) относительно широк и расположен спереди. **Б–Г.** По мере прохождения метаморфоза жаберные дуги исчезают, Меккелев хрящ удлиняется, вокруг него формируется нижняя челюсть (мандибула), а рогоподъязычный хрящ сужается и смещается назад

Из D. L. Betty et al., 1998.
Dev Biol 203: 24–35,
любезно предоставлено D. D. Brown

2) превращением T_4 в более активный гормон трийодтиронин (T_3) в тканях-мишенях; 3) деградацией T_3 в тканях-мишенях (рис. 21.3).

Попадая в клетки, T_3 связывается с ядерными рецепторами тиреоидных гормонов (TR) со значительно более высоким сродством, нежели T_4 , из-за чего эти факторы транскрипции активируют экспрессию генов. Таким образом, для запуска в каждой ткани ответов, ведущих к метаморфозу, принципиально содержание и T_3 , и T_4 в тканях-мишенях (Kistler et al., 1977; Robinson et al., 1977; Becker et al., 1997).

Концентрация T_3 в каждой ткани зависит от концентрации T_4 в крови и от двух важнейших внутриклеточных ферментов, убирающих атомы йода из молекул T_4 и T_3 . Дейодиназа II типа удаляет атом йода из внешнего кольца гормона-предшественника (T_4), превращая его в более активный T_3 . Дейодиназа III типа убирает атом йода из внутреннего кольца T_3 , переводя его в неактивную форму (T_2), которая в итоге метаболизируется до тирозина (Becker et al., 1997). Генетически модифицированные головастики с избыточной экспрессией дейодиназы III типа в тканях-мишенях неспособны завершить метаморфоз (Huang et al., 1999); следовательно, регуляция метаморфоза включает в себя тканеспецифичные изменения формы гормона с образованием той, что наиболее эффективно связывается с рецептором.

Рецепторы тиреоидных гормонов представляют собой ядерные белки двух типов. У *Xenopus* рецепторы тиреоидных гормонов типа α (TR α) широко распространены в тканях и присутствуют в организме даже до появления щитовидной железы. Ген,

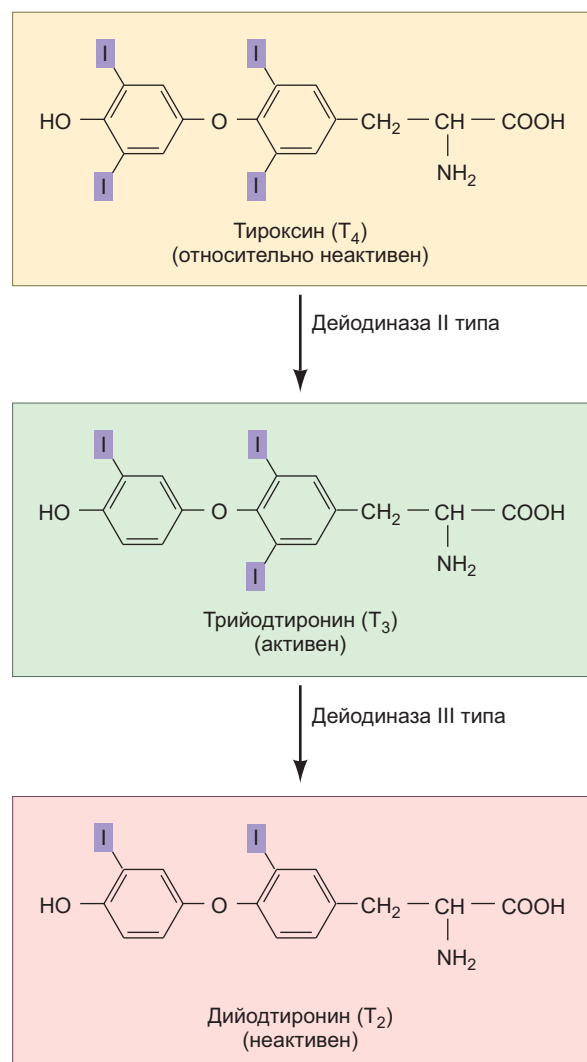


Рис. 21.3. Метаболизм тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3). T_4 служит прогормоном. Он переходит в активную форму T_3 в периферических тканях под действием дейодиназы II. T_3 может быть инактивирован дейодиназой III, переводящей его в дийодтиронин, который, как считается, не может вызвать метаморфоз

кодирующий **рецептор тиреоидных гормонов типа β (TR β)**, сам напрямую активируется связыванием TR β с тиреоидными гормонами, являя собой пример положительной обратной связи. Содержание TR β до начала метаморфоза очень мало; по мере нарастания количества тиреоидных гормонов в ходе метаморфоза растет и уровень TR β в клетке (**рис. 21.4**; Yanoita and Brown, 1990; Eliceiri and Brown, 1994). Как будет показано ниже, подобная положительная регуляция экспрессии гена, кодирующего рецептор гормона собственным продуктом, — общая черта метаморфоза в таксонах животных.

Тиреоидные рецепторы работают не одни, а в виде димеров с рецепторами ретиноидов RXR. Димеры TR-RXR связывают тиреоидные гормоны и способны усиливать транскрипцию (Mangelsdorf and Evans, 1995; Wong and Shi, 1995; Wolffe and Shi, 1999). Важно, что рецепторный комплекс TR-RXR физически

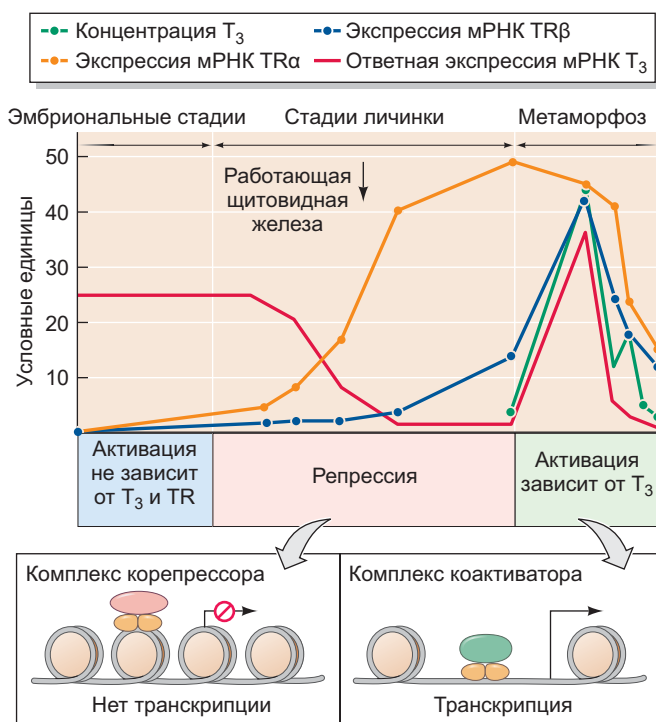


Рис. 21.4. Гормональный контроль метаморфоза *Xenopus*. Во время преметаморфоза тиреоидных гормонов мало и в отсутствие лигандов TR α связывается с хроматином и фиксирует репрессоры транскрипции, стабилизирующие нуклеосомы. В разгар метаморфоза уровень тиреоидных гормонов в крови растет и TR α связывается с тироксином, что вызывает замену репрессоров транскрипции на активаторы. Нуклеосомы разматываются, и активируются T_3 -чувствительные гены. Один из них кодирует рецептор TR β , который еще сильнее ускоряет ответы, связанные с метаморфозом. К концу концов ингибирование обратной связи снижает уровень тиреоидных гормонов в крови и метаморфоз завершается. (По данным: A. Grimaldi, 2013. *Biochim Biophys Acta* 1830: 3882–3892.)

связан с нужными промоторами и энхансерами еще до присоединения T_3 (Grimaldi et al., 2012). В такой форме TR-RXR является репрессором, привлекающим деацетилазы гистонов и другие корепрессорные белки к генам-мишеням и стабилизирующим нуклеосомы в области промотора. В то же время после связывания комплекса TR-RXR с T_3 репрессоры покидают его и заменяются такими коактиваторами, как ацетилтрансферазы гистонов. Коактиваторы вызывают распускание нуклеосом и активацию тех же самых генов, что раньше ингибировались (Sachs et al., 2001; Buchholz et al., 2003; Grimaldi et al., 2013). Таким образом, рецепторы тиреоидных гормонов выполняют две функции: в отсутствие лигандов подавляют экспрессию генов, предотвращая метаморфоз, и активируют экспрессию тех же самых генов после связывания T_3 (см. рис. 21.4).

Программы развития с региональной специфичностью

Различные области тела головастика реагируют на тиреоидные гормоны в разное время в зависимости от количества T_3 и рецепторов TR в клетках. Сам же тип ответа (пролиферация, апоптоз, дифференцировка, миграция) определяют другие факторы, присутствующие в тканях. Один и тот же стимул приводит к дегенерации одних тканей, одновременно стимулируя развитие и дифференцировку других, что можно наблюдать на примере дегенерации хвоста: тиреоидные гормоны указывают мышцам почки конечности расти (без тироксина они погибают) и в то же время дают команду к апоптозу мышцам хвоста (Cai et al., 2007).

Структуры хвоста резорбируются относительно быстро, так как окостенение скелета на него не распространяется (Wassersug, 1989). После окончания апоптоза в области хвоста скапливаются макрофаги, ферментативно переваривающие дебрис (в основном коллагеназами и металлопротеиназами), и хвост превращается в большой мешок с протеолитическими ферментами (Kaltenbach et al., 1979; Oofusa and Yoshizato, 1991; Patterson et al., 1995)¹. Эпидермис хвоста ведет себя иначе, чем эпидермис туловища или головы. Во время **метаморфного климкса** кожа личинки получает команду к апоптозу. В голове и теле головастика новый эпидермис создается из эпителиальных стволовых клеток. В эпидермисе хвоста, однако, эти клетки отсутствуют, поэтому создать новую кожу не удастся (Suzuki et al., 2002).

Органоспецифичность ответов на тиреоидные гормоны была ярко продемонстрирована пересад-

¹ Интересно, что дегенерация хвоста у человека, протекающая на четвертой неделе внутриутробного развития, напоминает резорбцию хвоста головастика (Fallon and Simandl, 1978).

кой кончика хвоста в область туловища и помещением глазной чаши на хвост (Schwind, 1933; Geigy, 1941). Кончик хвоста, помещенный на туловище, не получает защиту от разрушения, но глазная чаша остается целой, даже находясь в составе разрушающегося хвоста (рис. 21.5). Таким образом, реакция ткани на тиреоидные гормоны заложена в ней самой и не зависит от положения в личинке.

Превращение головастика в лягушек — один из наиболее быстрых и доступных примеров развития, очевидный даже для детей. И все же он до сих пор вызывает множество загадок. Что подтолкнет современное поколение исследователей к изучению восхитительных биологических проблем, которые ставит перед нами метаморфоз амфибий? (Cai et al., 2007). Недавние работы показали важность метаморфоза для изучения регенерации; кроме того, он представляет собой критичную область, в которой развитие и экология существенно влияют друг на друга.

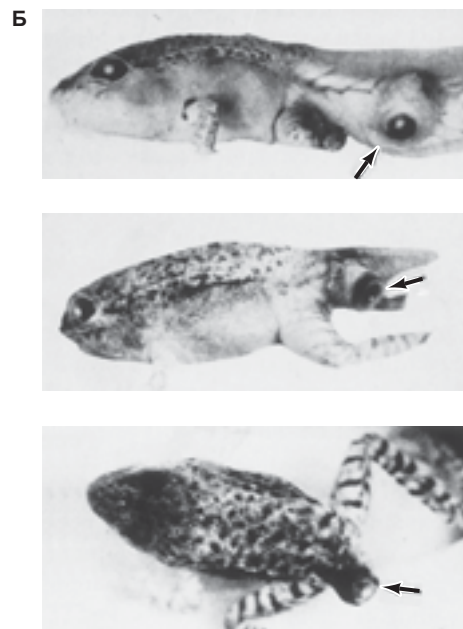
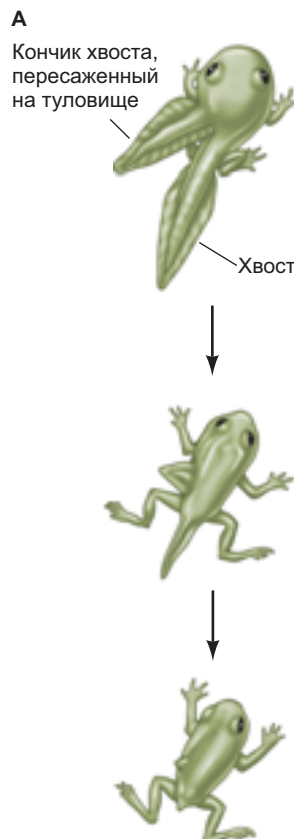
Метаморфоз у насекомых

Насекомые — самые многочисленные животные на Земле, и в сравнении с разнообразием их жизненных циклов меркнет научная фантастика. Основных паттернов развития насекомых три. У некоторых их представителей, например чешуйницы, нет личиночных стадий и развитие прямое (**аметаболия**)

(рис. 21.6А): непосредственно после вылупления наступает стадия **пронимфы**, содержащей структуры, обеспечивающие выход из яйца. Однако по завершении этой переходной стадии насекомое выглядит как уменьшенная взрослая особь; с каждой линькой оно увеличивается в размерах, но не меняет форму (Truman and Riddiford, 1999).

Другие насекомые, например кузнечики и клопы, проходят постепенное неполное превращение (**гемиметаболия**) (см. рис. 21.6Б). Проведя очень краткий период времени в виде пронимфы (кутикула которой часто сбрасывается во время линьки), насекомое начинает выглядеть как недозрелая взрослая особь и называется **нимфой**. У нее присутствуют зачатки крыльев, половых органов и других структур взрослого организма, и с каждой линькой они постепенно созревают. Результатом последней линьки становится крылатое половозрелое насекомое, или **имаго**.

У таких насекомых, как мухи, жуки, мотыльки и бабочки, имеет место развитие с полным превращением (**голометаболия**) и стадия пронимфы отсутствует (см. рис. 21.6В). Ювенильную форму, вылупляющуюся из яйца, называют **личинкой**. Личинка (например, гусеница) проходит серию линек с увеличением размера. Стадии между личиночными линьками называют **возрастами**. Число линек до наступления зрелости видоспецифично, хотя может уменьшаться или увеличиваться под действием факторов среды. Личинки постепенно увеличиваются



Из J. L. Schwind, 1933, *J Exp Zool* 66: 1–14

Рис. 21.5. Региональная специфичность в ходе метаморфоза лягушки. **А.** Кончики хвоста разрушаются даже после пересадки на туловище. **Б.** Глаза остаются интактными даже после пересадки на разрушающийся хвост. (Рис. А по данным: R. Geigy, 1941. *Rev Suisse Zool* 48: 483–494.)

от возраста к возрасту: каждая следующая больше предыдущей. Наконец, между личиночными стадиями и взрослой формой происходит радикальная и внезапная трансформация: пройдя последний возраст, личинка претерпевает **линьку метаморфоза**, становясь **куколкой**. Куколка не питается и должна обходиться энергией из пищи, употребленной личинкой. Во время окукливания взрослые структуры формируются и замещают личиночные. В конце концов, путем **линьки на имаго** под кутикулой куколки образуется взрослая особь (имаго), которая позже сбрасывает покровы куколки, выходя из нее по аналогии с тем, как личинка вылупляется из яйца. Кэррол Уильямс (1959) характеризовал голометабо-

лизм как переключение между пропитанием и размножением: «Привязанные к земле ранние стадии развивали огромные пищеварительные системы и таскали их вокруг на гусеницах. Позднее в жизненной истории эти активы будут ликвидированы и инвестированы в построение совершенно нового организма — летающей машины для секса».

Имагинальные диски

У насекомых с полным превращением трансформация ювильной особи во взрослую происходит внутри кутикулы куколки. Большая часть тела ли-

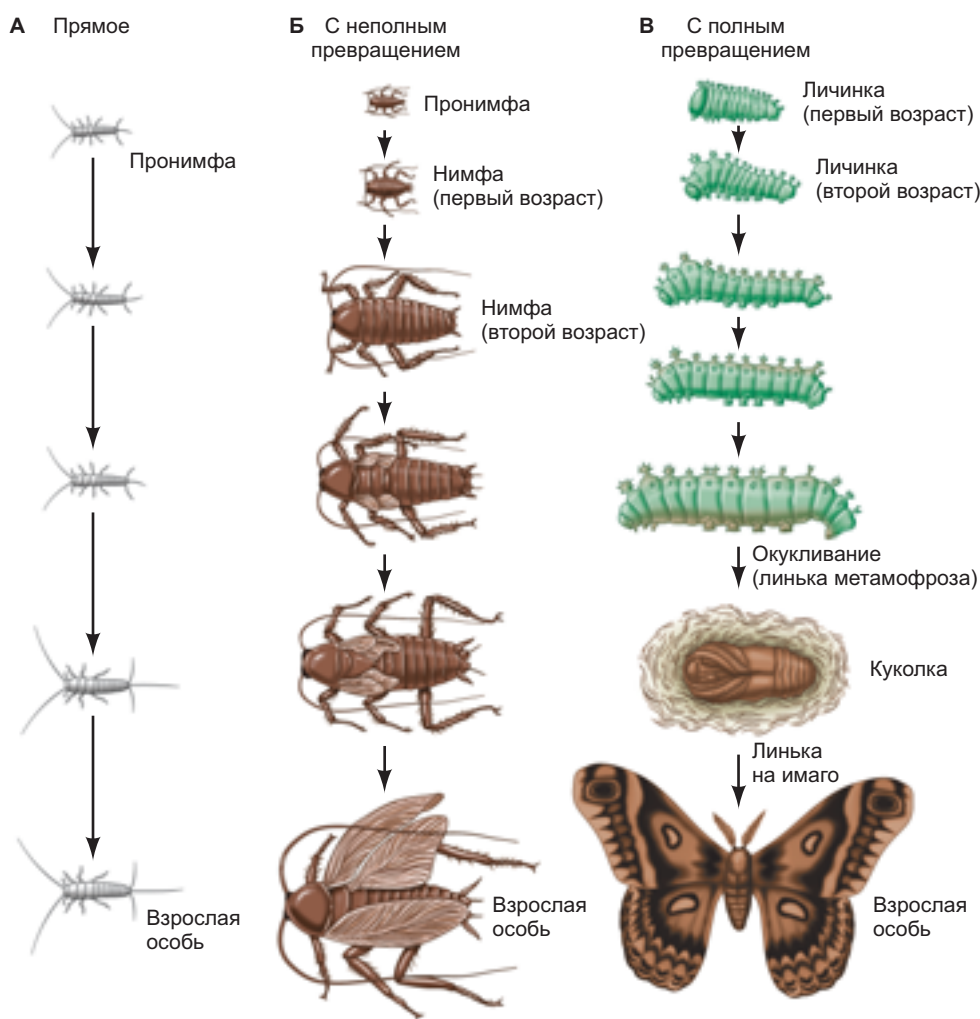


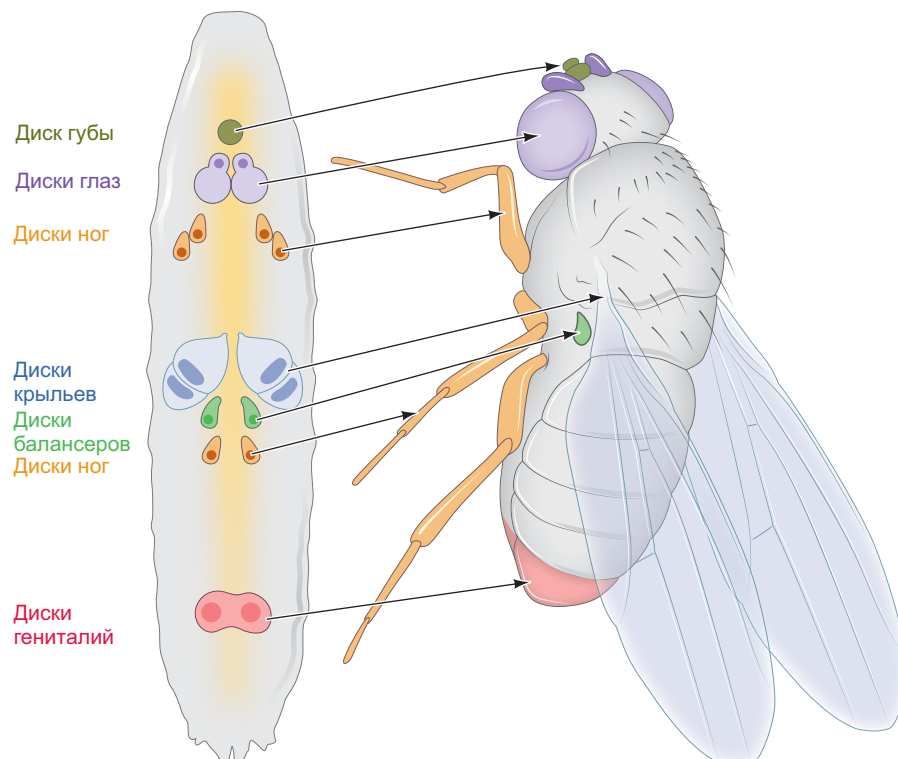
Рис. 21.6. Варианты развития у насекомых. Линьки отмечены стрелками. **А.** Прямое развитие (аметаболия) у чешуйницы. После короткой стадии пронимфы насекомое выглядит как взрослое, но уменьшенное. **Б.** Развитие с неполным превращением (гемиметаболия) у таракана. После очень короткой стадии пронимфы насекомое становится нимфой. После каждой линьки очередная возрастная стадия нимфы выглядит все более похожей на взрослую форму с постепенно растущими крыльями и половыми органами. **В.** Развитие с полным превращением (голометаболия) у мотыльков. Вылупившаяся личинка проходит серию личиночных линек, после чего линька метаморфоза переводит ее в стадию куколки. После линьки на имаго взрослая особь вылупляется из оболочки куколки с новой кутикулой

чинки последовательно уничтожается в результате программируемой клеточной гибели, в то время как новые взрослые органы развиваются из относительно недифференцированных групп **имагинальных клеток**. Таким образом, в каждой личинке соседствуют две различные популяции клеток: личиночные клетки, использующиеся для нужд ювенильной особи, и тысячи имагинальных клеток, лежащих кластерами внутри личинки в ожидании сигнала к дифференцировке.

Существует три основных типа имагинальных клеток (**рис. 21.7**):

1. Клетки **имагинальных дисков**, формирующие кутикулярные структуры взрослой особи, в том числе крылья, ноги, антенны, глаза, голову, грудь и половые органы.
2. **Гистиобласты** — имагинальные тканеобразующие клетки, из которых строится брюшко взрослой особи.
3. Кластеры имагинальных клеток в составе каждого органа, пролиферирующие органы взрослой формы по мере дегенерации личиночных.

В недавно вылупившейся личинке имагинальные диски видны как небольшие утолщения эпидермиса. В каждом диске ранней личинки *Drosophila* находится 10–50 клеток, а всего таких дисков у этих мух 19. Эпидермис головы, груди и конечностей образуется из 9 пар дисков, расположенных по обеим сторонам тела, в то время как эпидермис половых органов происходит из единственного диска, расположенного на средней линии тела.



Большинство клеток личинки имеют ограниченную способность к митозу, но клетки имагинальных дисков быстро делятся в определенные характерные моменты времени. По мере пролиферации клеток в дисках формируется трубчатый эпителий, сворачивающийся в компактную спираль (**рис. 21.8А**). Во время метаморфоза клетки продолжают пролиферировать, в то время как диски дифференцируются и удлиняются (**рис. 21.8Б**). На **рис. 21.9** представлена карта презумптивных зачатков и последовательность удлинения одного из шести дисков ног *Drosophila*. В конце третьего возраста, перед самым окукливанием, диск ноги представляет собой эпителиальный мешок, соединенный тонким стебельком с эпидермисом личинки. На одной стороне мешка эпителий свернут в серию концентрических кругов, напоминающую «датскую выпечку» (Kalm et al., 1995). С началом окукливания клетки центральной части диска выдвигаются наружу, становясь дистальными структурами ноги — коготками и лапкой. Клетки внешних кругов становятся проксимальными структурами — тазиком и прилежащим эпидермисом (Schubiger, 1968). После дифференцировки клетки конечностей и эпидермиса выделяют кутикулу, соответствующую их положению. Несмотря на то что диск состоит в основном из эпидермальных клеток, на ранних стадиях развития в него мигрирует небольшое количество **адипителлиальных клеток**. На стадии куколки из них образуются мышцы и нервы, формирующие ногу.

Рис. 21.7. Расположение и направление развития имагинальных дисков и имагинальных тканей личинки третьего возраста (слева) у *Drosophila melanogaster*. (По данным: J. S. Jaszczak and A. Halme, 2016. *Curr Opin Genet Dev* 40: 87–94.)

ВЫВОРАЧИВАНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА

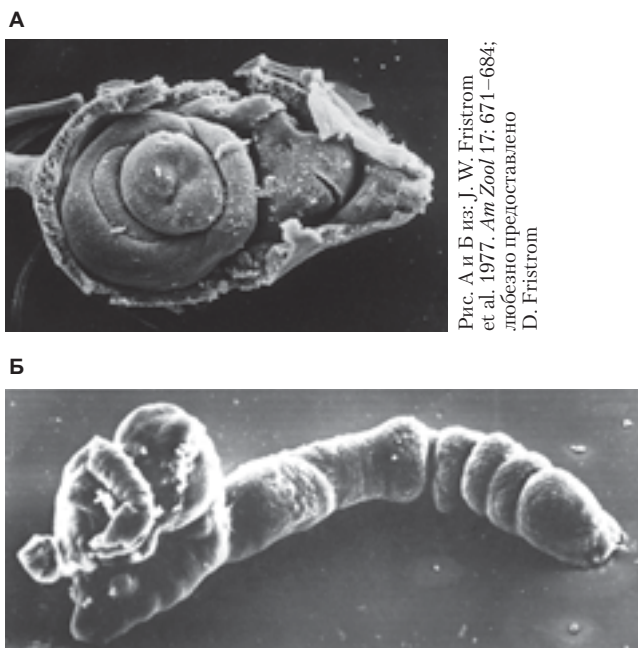


Рис. А и Б из: J. W. Fristrom et al. 1977. *Am Zool* 17: 671–684; любезно предоставлено D. Fristrom

Рис. 21.8. Удлинение имажинальных дисков. Сканирующая электронная микроскопия диска ноги личинки третьего возраста *Drosophila* (А) до и (Б) после удлинения

Зрелый диск ноги личинки *Drosophila* третьего возраста на вид не имеет ничего общего со взрослой структурой. Он детерминирован, но еще не дифференцирован; для его дифференцировки требуется сигнал в форме нескольких выбросов «гормона линьки» 20-гидроэксдизона (экдистена) (20E; **рис. 21.10А**). Первый сигнал, происходящий на поздних личиночных стадиях, запускает образование куколки, блокирует клеточное деление в диске и вызывает изменение формы клеток, опосредующее выворачивание ноги. Клетки дисков у личинок третьего возраста плотно уложены вдоль проксимально-дистальной оси. Получив гормональный сигнал к дифференцировке, они меняют форму, отчего нога выворачивается так, что клетки из центра диска становятся дистальными клетками конечности (коготками) (Condic et al., 1991; Taylor and Adler, 2008). Структуры ноги дифференцируются в куколке, чтобы к моменту выхода из нее взрослой мухи оказаться полностью сформированными и функциональными: на самом деле взрослая особь использует ноги уже для самого выхода из оболочки куколки.

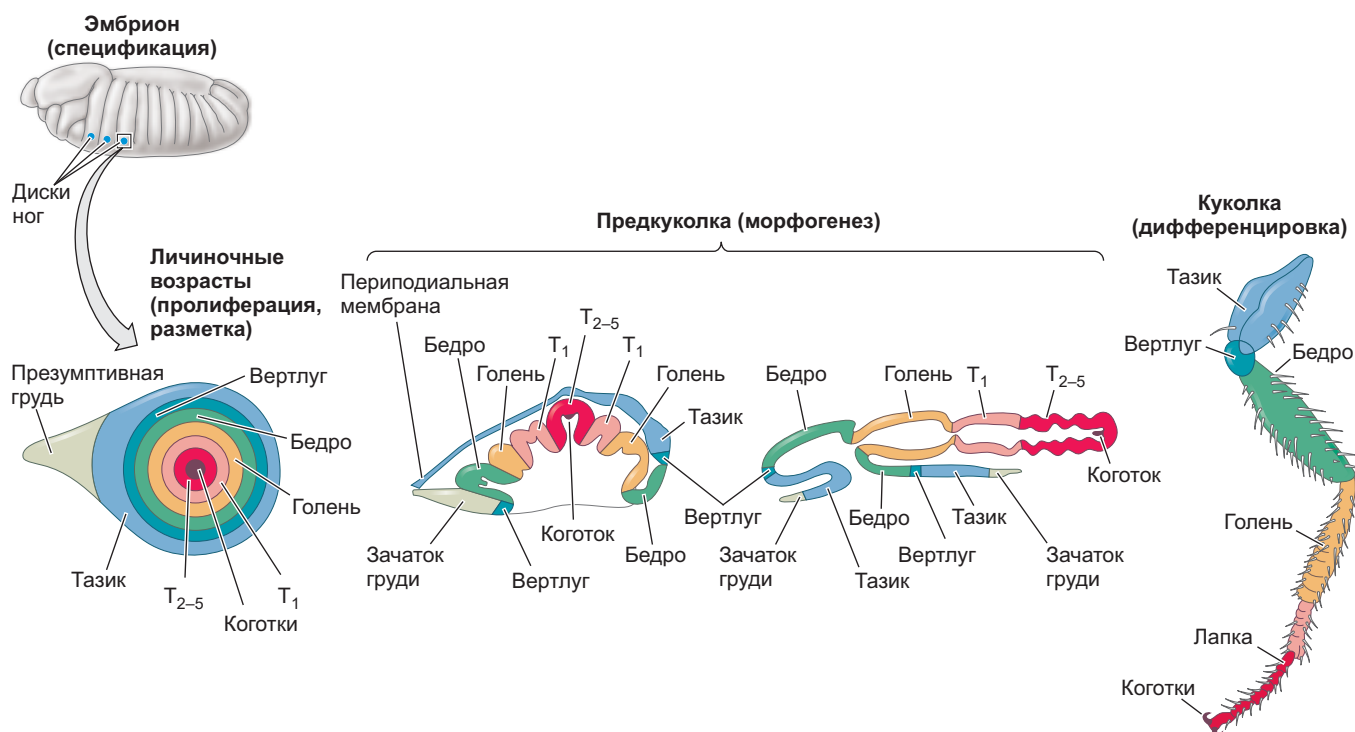


Рис. 21.9. Последовательность развития имажинального диска ноги у *Drosophila*. Определение типа диска происходит на стадии эмбриона. Пролиферация его клеток и закладывание конкретных типов клеток ноги, которые будут сформированы из данного диска, идут на личиночных стадиях. Удлинение диска имеет место на ранней стадии окукливания (предкуколки), а дифференцировка тканей ноги протекает, пока насекомое представляет собой куколку. T₁ — базальный псевдосегмент лапки; T₂₋₅ — сегменты лапки 2–5. (По данным: D. Fristrom and J. W. Fristrom, 1975. *Dev Biol* 43: 1–23; L. von Kalm et al., 1995. *BioEssays* 17: 693–702.)

Гормональный контроль метаморфоза у насекомых

Несмотря на то что детали метаморфоза у видов насекомых различаются, в целом характер действия гормонов очень схож. Как и у амфибий, метаморфоз насекомых регулируют системные гормональные сигналы, которые в свою очередь контролируют

нейросекреторные гормоны мозга (Gilbert and Goodman, 1981; Riddiford, 1996). Линька и метаморфоз насекомых подчинены двум действующим гормонам: стероидному гормону 20-гидроэкдизон (20E) и липидному ювенильному гормону (ЮГ) (рис. 21.11А). 20E запускает и координирует каждую линьку (будь то линька на личинку, на куколку или на имаго) и регулирует изменения экспрессии генов, которые

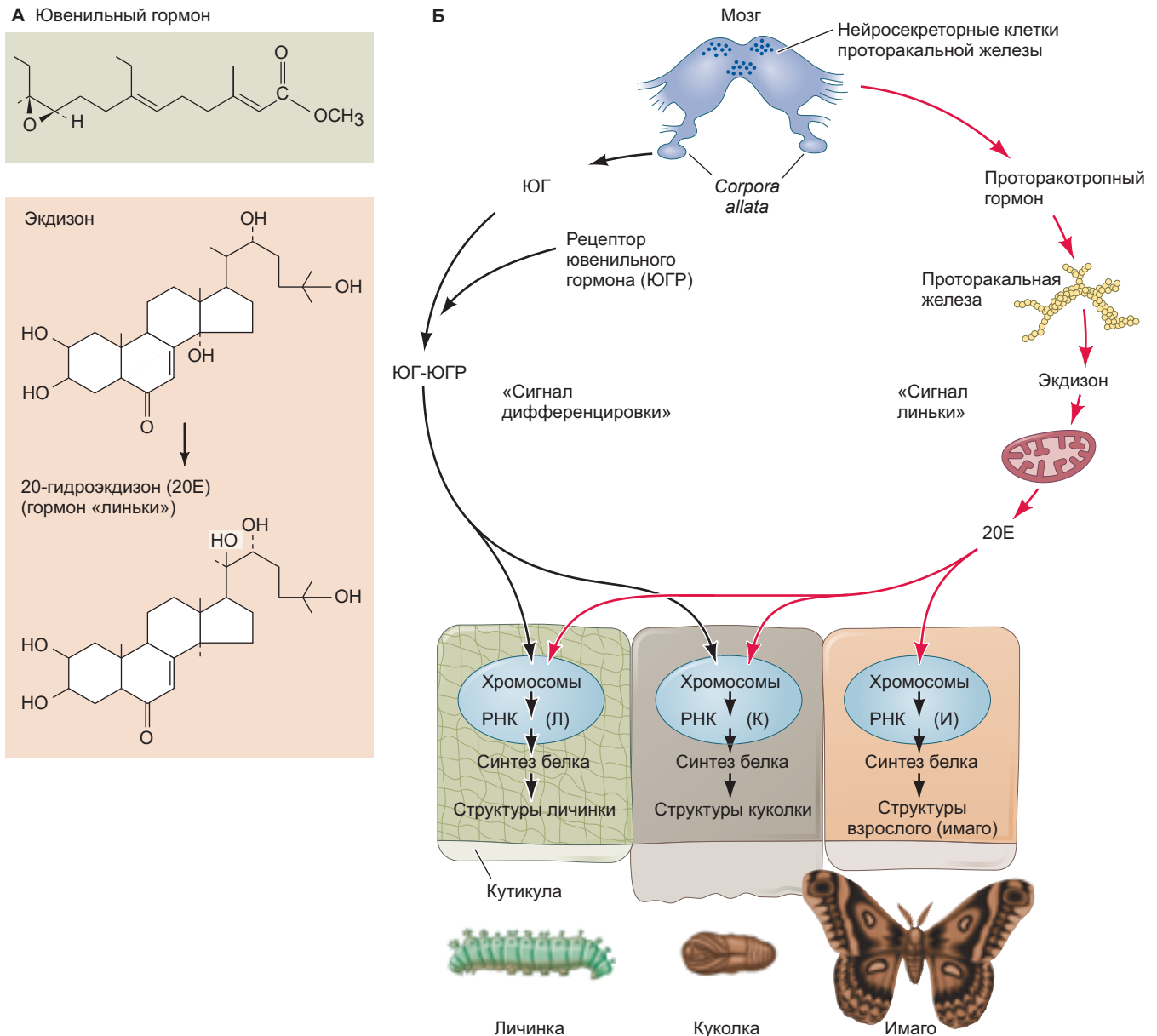
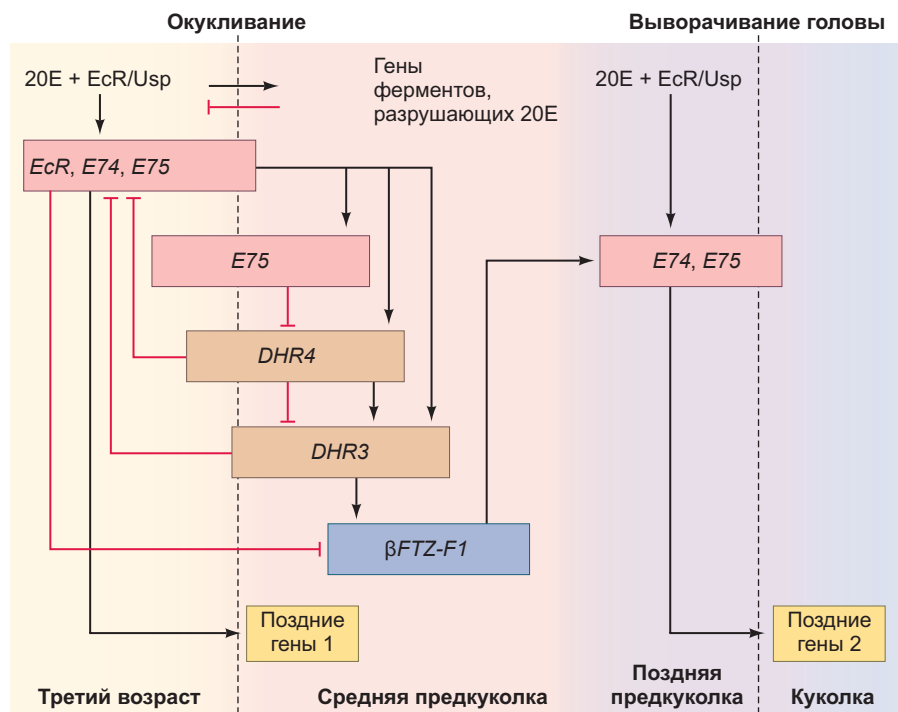


Рис. 21.10. Регуляция метаморфоза у насекомых. **А.** Структуры ювенильного гормона (ЮГ), экдизона и активного гормона линьки 20-гидроэкдизона (20E). **Б.** Общий путь метаморфоза у насекомых. 20E и ЮГ вместе вызывают линьку на следующий личиночный возраст. Когда концентрация ЮГ становится достаточно низкой, вызванная 20E линька производит куколку вместо очередной личинки. Когда 20E действует в отсутствие ЮГ, имагинальные диски дифференцируются и происходит линька на имаго (взрослую особь). (Рис. А по данным: L. I. Gilbert and W. Goodman, 1981. *In Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology*, L. I. Gilbert and E. Frieden [Eds.], pp. 139–176. Plenum: New York; Рис. Б по данным: L. I. Gilbert et al., 1980. *Recent Prog Horm Res* 36: 401.)

Рис. 21.11. 20-гидроэкдизон запускает каскады развития. **А.** Схематичное изображение основных каскадов экспрессии генов в ходе метаморфоза *Drosophila*. Связываясь с рецепторным комплексом EcR/Usp, 20E активирует гены раннего ответа, включая *E74*, *E75* и *Broad*. Их продукты активируют поздние гены. Активированный комплекс EcR/Usp запускает также экспрессию серии генов, продукты которых являются транскрипционными факторами и в свою очередь активируют ген *βFTZ-F1*. Белок *βFTZ-F1* модифицирует хроматин таким образом, что следующий выброс 20E активирует уже другой набор поздних генов. Продукты этих генов тоже ингибируют гены, экспрессирующиеся раньше, в том числе кодирующие рецептор EcR. (По данным: K. King-Jones et al., 2005. *Cell* 121: 773–784.)



имеют место во время метаморфоза. Высокое содержание ЮГ предотвращает вызванные экдизоном изменения экспрессии генов, необходимые для метаморфоза. Таким образом, присутствие ЮГ во время линьки на личинку гарантирует, что ее результатом будет именно личинка следующего возраста, а не куколка или взрослая особь. Когда концентрация ЮГ снижается достаточно, вызванная 20E линька заканчивается образованием куколки вместо личинки. В случае работы 20E на фоне полного отсутствия ЮГ имагинальные диски дифференцируются и линька дает начало взрослому организму (рис. 21.11Б).

Процесс линьки запускается в мозге путем выброса **проторакотропного гормона (ПТТГ)** в ответ на нейральные, гормональные сигналы или сигналы окружающей среды (рис. 21.11Б). Этот пептидный гормон стимулирует выработку **экдизона проторакальной железой**, активируя сигнальный путь **рецепторных тирозинкиназ (RTK)** в ее клетках (Rewitz et al., 2009; Ou et al., 2011). Затем в периферических тканях экдизон модифицируется с образованием активного гормона линьки 20E. Каждую линьку запускает один или несколько выбросов 20E. Во время линьки на личинку первый выброс приводит к небольшому увеличению концентрации 20E в гемолимфе личинки и сдвигу коммитирования эпителиальных клеток. Второй, более выраженный, выброс 20E запускает дифференцировки, связанные с линькой. Эти выбросы 20E коммитируют клетки эпидермиса и стимулируют в них синтез ферментов, расщепляющих старую кутикулу, и образование новой кутикулы.



Загадки развития

Как можно держать под контролем болезни, например малярию, путем вмешательства в метаморфоз насекомых?

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

ТИТРОВАНИЕ ЮВЕНИЛЬНОГО ГОРМОНА ДЛЯ КАЖДОГО ПЕРЕХОДА

Линьки на личинку происходят в присутствии высокого титра ЮГ. Этот гормон выделяется в *corpora allata* (скоплении клеток, прилежащих к головному мозгу). Секреторные клетки прилежащих тел активны во время линек на личинку, но не работают во время линьки метаморфоза и линьки на имаго. У личинок последнего возраста уровень ЮГ падает за счет двух механизмов: выработку ЮГ в прилежащих телах ингибируют сигналы от мозга, и в то же время в организме увеличивается способность к деградации ЮГ (Safranek and Williams, 1989). Происходит высвобождение ПТТГ из мозга (Nijhout and Williams, 1974; Rountree and Bollenbacher, 1986). ПТТГ, в свою очередь, стимулирует выработку небольшого количества экдизона в проторакальной железе. В результате имеет место выброс 20E на фоне низкого уровня ЮГ, что направляет эпидермальные клетки по пути

развития куколки. Пул личиночных мРНК не пополняется, к тому же синтезируются новые мРНК, чьи белковые продукты ингибируют транскрипцию с мРНК личинки.

В ходе метаморфоза *Drosophila* происходит два крупных выброса 20E. Выброс на стадии личинки третьего возраста запускает «подготовительный» морфогенез в имагинальных дисках ног и крыльев, а также отмирание задней части личиночной кишки. Личинка перестает питаться и мигрирует в поисках места для окукливания.

Второй выброс через 10–12 ч после первого руководит превращением предкуколки в куколку. Выворачивается голова, дегенерируют слюнные железы (Riddiford, 1982; Nijhout, 1994). Таким образом, первый выброс 20E в личинке последнего возраста инактивирует личиночные гены и иницирует морфогенез структур имагинальных дисков. Второй выброс запускает транскрипцию генов, характерных для куколки, и иницирует линьку (Nijhout 1994). В ходе линьки на имаго, когда 20E действует в отсутствие ювенильного гормона, имагинальные диски полностью дифференцируются и в результате образуется взрослая особь.

Молекулярная биология активности 20-гидроэкдизона

РЕЦЕПТОРЫ ЭКДИЗОНА

Как и тиреоидные гормоны амфибий, 20E не может связаться с ДНК самостоятельно. Сначала он должен провзаимодействовать с ядерными белками, **рецепторами экдизона** (EcR). EcR эволюционно связаны с рецепторами тиреоидных гормонов амфибий и практически идентичны им по структуре. Белок EcR образует активную молекулу, димеризуясь с белком Ultraspiracle (Usp). Usp является гомологом белка амфибий RXR, который, как мы узнали ранее, димеризуется с TR с образованием активной формы рецептора тиреоидных гормонов (Koelle et al., 1991; Yao et al., 1992; Thomas et al., 1993). У насекомых белки EcR и Usp связываются с ДНК и затем димеризуются на энхансерных или промоторных элементах чувствительных к экдизону генов (Szamborska-Gbur et al., 2014). Считается, что в отсутствие связанного EcR Usp привлекает в эти области ингибиторы транскрипции (Tsai et al., 1999). Ингибирование сменяет активация, когда экдизон связывается со своим рецептором. Присутствие комплекса экдизон–EcR–Usp привлекает метилтрансферазы гистонов, *активирующие* чувствительные в экдизону гены (Sedkov et al., 2003).

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

КАСКАДЫ РАЗВИТИЯ, ИНИЦИИРУЕМЫЕ 20-ГИДРОЭКДИЗОНОМ

Ход метаморфоза *Drosophila* в упрощенном варианте представлен на **рис. 21.12**. Вначале гормон линьки 20-гидроэкдизон (20E) связывается с рецепторным комплексом EcR–Usp, что активирует гены раннего ответа, включая *E74* и *E75*, а также *Broad* и сам ген *EcR*. Кодированные этими генами транскрипционные факторы активируют вторую серию генов, таких как *E75*, *DHR4* и *DHR3*. Их продукты являются транскрипционными факторами и совместными усилиями формируют куколку. Далее продукты генов второй волны выключают гены раннего ответа, чтобы они не вмешивались во второй выброс 20E. Наконец, 20E активирует гены, продукты которых инактивируют и деградируют сам экдизон. В результате ядро очищается от гормона, чтобы быть способным среагировать на его второй выброс. Более того, 20E обычно ингибирует ген, кодирующий β FTZ-F1. Теперь же этот транскрипционный фактор может синтезироваться, что позволяет новой группе генов среагировать на второй выброс 20E (Rewitz et al., 2009). К тому же, DHR4 координирует рост и поведение личинки. Благодаря ему личинка по достижении определенного веса перестает питаться и начинает искать место для прикрепления и окукливания (Urness and Thummel, 1995; Crossgrove et al., 1996; King-Jones et al., 2005).

Детерминация имагинального диска крыла

Когда работу экдизона не корректирует ювенильный гормон, он активирует рост и дифференцировку уже детерминированных имагинальных дисков. Например, крупнейшего из имагинальных дисков *Drosophila* — крылового, содержащего около 60 000 клеток. (Для сравнения: диски ног и балансеров содержат примерно по 10 000 клеток; Fristrom, 1972.) Диски крыльев отличается от остальных экспрессия гена *vestigial* (Kim et al., 1996). Когда этот ген экспрессируется в любом другом имагинальном диске, из него развивается ткань крыла.

ПЕРЕДНИЙ И ЗАДНИЙ ОТДЕЛЫ

Оси крыла определяют паттерны экспрессии генов, делящие эмбрион на обособленные, но взаимодействующие области (рис. 21.12A; Meinhardt, 1980; Causo et al., 1993; Tabata et al., 1995). Определение передне-задней оси крыла начинается на стадии ли-

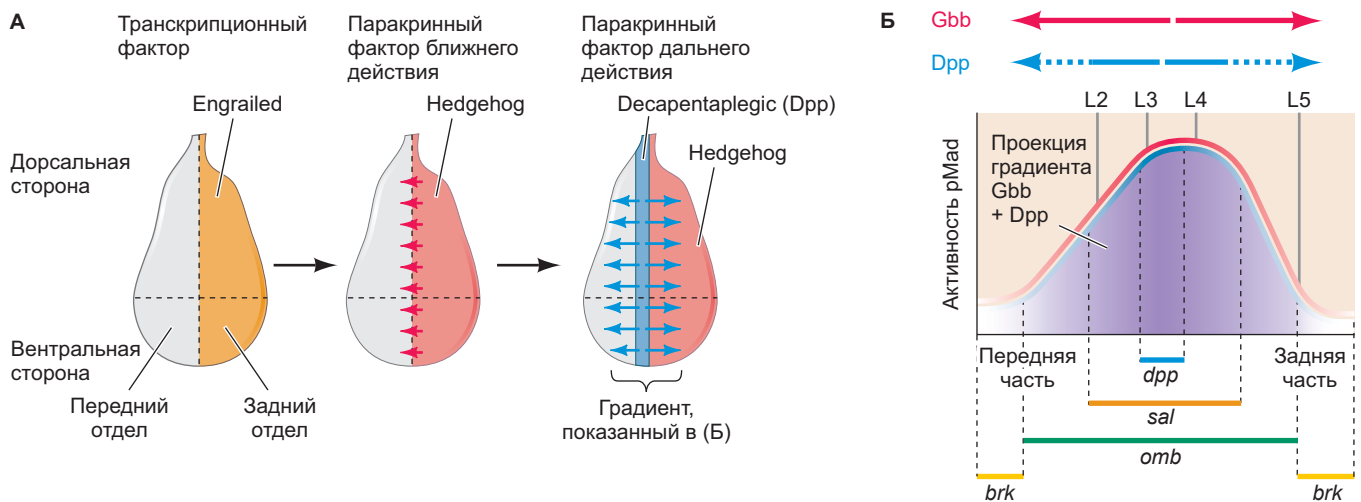


Рис. 21.12. Компартментализация и установление передне-задней разметки имажинального диска крыла. **А.** У личинки первого возраста уже сформирована передне-задняя ось; ее можно распознать по экспрессии гена *engrailed* в заднем отделе. Белок Engrailed, будучи транскрипционным фактором, активирует ген *hedgehog*. Белок Hedgehog является паракринным фактором ближнего действия и активирует *decapentaplegic (dpp)* в ближних рядах передних клеток, и в них белок Decapentaplegic (Dpp) и близкий к нему белок Glass-bottom boat (Gbb) действуют на большем расстоянии. **Б.** Белки Dpp и Gbb создают градиент активности BMP-подобного сигнального пути, измеряемый через фосфорилирование Mad (pMad). Высокие концентрации Dpp и Gbb вблизи источника активируют гены *spalt (sal)* и *optomotor blind (omb)*. Более низкие концентрации (ближе к периферии) активируют *omb*, но не *sal*. Когда уровень Dpp и Gbb падает ниже определенного порога, снимается репрессия гена *brinker (brk)*. L2–L5 обозначают продольные жилки крыла, из которых L2 — самая передняя. (Рис. А по данным: L. Wolpert et al., 1998. *Principles of Development*. Oxford University Press: Oxford; рис. В по данным: E. Bangi and K. Wharton, 2006. *Dev Biol* 295: 178–193.)

чинки первого возраста. В это время задняя часть крыла начинает отличаться от передней за счет экспрессии гена *engrailed*. Транскрипционный фактор Engrailed образуется только в задней части и активирует в ее клетках ген, кодирующий паракринный фактор Hedgehog. Диффузия Hedgehog довольно сложным образом активирует гены, кодирующие гомологи BMP Decapentaplegic (Dpp) и Glass-bottom boat (Gbb) в узкой полоске клеток в передней части диска крыла (Ho et al., 2005).

Эти белки устанавливают градиент сигнальной активности BMP (Matsuda and Shimmi, 2012), измеряемый по уровню фосфорилирования транскрипционного фактора Mad (белка Smad), так как BMP активируют Mad. Dpp является паракринным фактором ближнего действия, в то время как Gbb диффундирует на куда большие расстояния, формируя градиент (рис. 21.12Б; Bangi and Wharton, 2006). Этот сигнальный градиент регулирует масштаб пролиферации клеток и определяет их развитие (Rogulja and Irvine, 2005; Hamaratoglu et al., 2014). На активацию Mad некоторые гены транскрипционных факторов отвечают по-разному. Когда его уровень высок, активируются гены *spalt (sal)* и *optomotor blind (omb)*, в то время как при низком уровне (когда основной сигнал исходит от Gbb) активируется *omb*. Ниже

определенного уровня активности фосфорилированного Mad снимается ингибирование гена *brinker (brk)*; таким образом, *brk* экспрессируется вне домена его сигналинга. Специфические судьбы клеток крыла определяются в ответ на действие этих транскрипционных факторов. (Например, пятая продольная жилка крыла формируется на границе экспрессии генов *optomotor blind* и *brinker*, см. рис. 21.12В.) Экспериментальные данные показывают, что Dpp регулирует рост крыльев, задействованные при этом механизмы все же остаются неизвестными (Hamaratoglu et al., 2014; Hariharan, 2015).

ДОРСАЛЬНО-ВЕНТРАЛЬНАЯ И ПРОКСИМАЛЬНО-ДИСТАЛЬНАЯ ОСИ

Дорсально-вентральная ось крыла образуется на стадии личинки второго возраста за счет экспрессии гена *apterous* в будущих дорсальных клетках диска крыла (Blair, 1993; Diaz-Benjumea and Cohen, 1993). Она отличает верхний слой крыла от нижнего (Bryant, 1970; Garcia-Bellido et al., 1973). В вентральной части диска крыла сохраняется активность гена *vestigial* (рис. 21.13А). В дорсальной части крыла синтезируются трансмембранные белки, которые

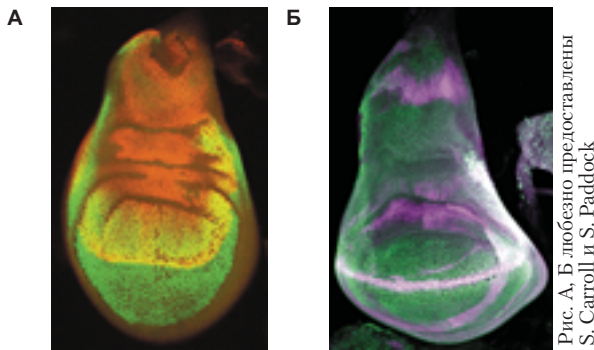
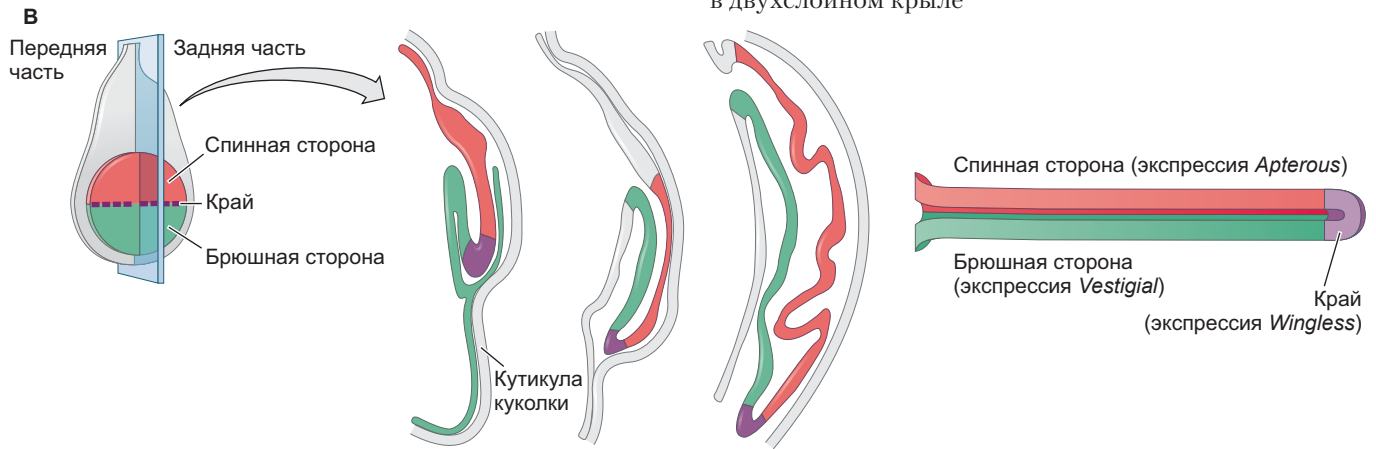


Рис. 21.13. А, Б любезно предоставлены S. Carroll и S. Paddock



предотвращают взаимопроникновение дорсальных и вентральных клеток (Milán et al., 2005). На границе дорсального и вентрального отделов транскрипционные факторы Apterous и Vestigial взаимодействуют, активируя ген, кодирующий паракринный фактор семейства Wnt Wingless (рис. 21.13Б). Показано, что белок Wingless работает как фактор роста, стимулируя пролиферацию клеток, за счет которой увеличивается крыло (Neumann and Cohen, 1996). Кроме того, он помогает установить проксимально-дистальную ось крыла: в высокой концентрации активи-

Рис. 21.13. Определение дорсально-вентральной оси. **А.** Будущая вентральная поверхность крыла окрашена антителами к белку Vestigial (зеленый), в то время как будущая дорсальная поверхность окрашена антителами к белку Apterous (красный). Желтый участок показывает краевую зону, в которой представлены оба белка. **Б.** Белок Wingless (фиолетовый), синтезирующийся в краевой области, организует диск крыла вдоль дорсально-вентральной оси. Экспрессию Vestigial (зеленый) можно наблюдать вблизи клеток, экспрессирующих Wingless. **В.** Дорсальная и вентральная части диска крыла выдвигаются наружу с образованием двухслойного крыла. Показаны паттерны экспрессии генов в двухслойном крыле

рует ген *Distal-less*, который определяет самые дистальные участки крыла (Neumann and Cohen, 1996, 1997; Zecca et al., 1996). Это происходит в середине диска крыла, которая далее выдвигается наружу, становясь дистальным краем крыла (рис. 21.13В). Таким образом, разметку диска крыла осуществляет набор паракринных факторов, снабжающий каждую клетку координатами по дорсально-вентральной, проксимально-дистальной и передне-задней осям. Во время метаморфоза мы вновь наблюдаем те процессы, которые формировали тело личинки.

О фотографии в начале главы



© The Natural History Museum/
Alamy Stock Photo

Как писал Альфред Теннисон (1886), старый порядок меняется, уступая место новому. Метаморфоз делит особь на две обособленные стадии жизненного цикла с различной анатомией, различной физиологией, разными экологическими нишами. Жизненный цикл насекомых был открыт и задокументирован в начале XVIII в. Марией Сибиллой Мериан, художницей, рисовавшей, среди прочего, в Южной Америке суринамских бабочек. Эта часть литографии Мериан (1705) показывает личинку, куколку и взрослую форму *Morpho deidamia*. Гусеница поедает листья барбадосского вишневого дерева; куколка этого вида напоминает их внешне. Мериан подметила также, что личинки различных видов нуждаются в иных растениях, чем их взрослые бабочки. Во многих случаях пища личинок содержит опасные химические вещества, которые «впитывает» взрослая особь. Гусеницы бабочек-монархов, к примеру, получают из растений токсичные алкалоиды, которые делают прошедшую метаморфоз особь непривлекательной добычей для птиц (и птицы учатся избегать бабочек-монархов).



Коротко Метаморфоз

1. Метаморфоз амфибий включает как морфологические, так и биохимические изменения. Часть структур перестраивается, часть замещается, формируется ряд новых.
2. За метаморфоз амфибий отвечает гормон трийодтиронин (T_3). Синтез T_3 из тироксина (T_4) и деградация T_3 дейодиназами могут регулировать метаморфоз в различных тканях. T_3 связывается с рецепторами тиреоидных гормонов, действующими преимущественно как регуляторы транскрипции.
3. Многие изменения в ходе метаморфоза амфибий регионально специфичны. Мышцы хвоста дегенерируют, мышцы туловища сохраняются. Глаз сохраняется, даже будучи пересажен на дегенерирующий хвост.
4. Изменения, связанные с метаморфозом, могут осуществляться путем клеточной гибели, дифференцировки или переключения клеточных типов.
5. Расписание событий метаморфоза могут определять процессы, имеющие место на фоне различного содержания тиреоидных гормонов.
6. У животных с прямым развитием личинок нет. У первичных личинок (например, морского ежа) оси тела закладываются иначе, чем у взрослой особи, в то время как у вторичных личинок (например, насекомых и амфибий) оси тела совпадают с осями взрослой особи того же вида.
7. Прямое развитие у насекомых называют аметаболизмом. В случае неполного превращения (гемиметаболизма) насекомое проходит серию стадий нимфы, на которых незрелый организм обычно представляет собой уменьшенную версию взрослой формы.
8. У насекомых с голометаболизмом (полным превращением) присутствует яркая трансформация личинки в куколку и затем в половозрелую взрослую форму. Промежутки между линьками называют возрастами личинки. Достигнув последнего возраста, личинка проходит линьку метаморфоза на куколку, а куколка — на имаго и становится взрослой формой.
9. На стадии куколки имагинальные диски и гистиобласты растут и дифференцируются, выстраивая структуры взрослого организма.
10. Передне-задняя, дорсально-вентральная и проксимально-дистальная оси последовательно определяются путем взаимодействия разных участков имагинального диска. Диск «выдвигается» наружу во время развития, в результате чего его центральная часть оказывается дистальной.
11. Линьку вызывает гормон 20-гидроэкдизон (20E). В присутствии большого количества ювенильного гормона (ЮГ) результатом линьки становится личинка следующего возраста. При низкой концентрации ЮГ происходит линька на куколку, а при полном его отсутствии — на имаго.
12. Рецепторы экдизона почти идентичны рецепторам тиреоидных гормонов амфибий по структуре и эволюционно с ними связаны.
13. С гена рецептора экдизона может производиться как минимум три различных белка. Типы рецепторов экдизона в клетках способны определять ее ответ на 20E. Рецепторы экдизона связываются с ДНК, активируя или подавляя транскрипцию.

Регенерация:

развитие на службе восстановления

22

Четыре головы лучше, чем одна?



С разрешения: Junji Morokuma и Michael Levin

Развитие никогда не прекращается. В течение жизни новые клетки крови, эпидермиса и эпителия пищеварительного тракта непрерывно образуются из стволовых. Еще более очевидное повторение эмбрионального развития — восстановление взрослым животным утраченной части тела в ходе регенерации. Регенерация всегда захватывала воображение писателей, художников и представителей Голливуда то в виде источника вечной молодости Понсе де Леоны, то в виде супергероя Дэдпула. Но этот процесс не является уделом научной фантастики. Регенерация захватила и умы ученых, которые приложили огромные усилия для выяснения механизмов развития, определяющих способность некоторых видов демонстрировать фантастический регенерационный потенциал. К примеру, отдельные взрослые саламандры могут отращивать конечности и хвосты после ампутации (процесс, на удивление схожий с описанием детской ручки Дэдпула)¹. Наблюдая явление регенерации конечности саламандры, трудно не задаваться вопросом, почему люди не могут заново отращивать руки и ноги. Что дает этим животным способность, которой нам так мучительно не хватает? Экспериментальная биология родилась из попыток натуралистов XVIII в. ответить на этот вопрос (Morgan, 1901). Опыты по регенерации, проведенные

¹ В фильме «Дэдпул» 2016 г. Уэйд Уилсон регенерирует руку после полной ампутации. Сначала образуется маленькая детская ручка, которая затем вырастает. У аксолотля, или мексиканской саламандры, тоже сначала регенерирует маленькая, хотя хорошо сформированная конечность, которая впоследствии дорастает до нужного размера, становясь полностью пропорциональной размерам животного. Однако на основании вышедшего в 2018 г. «Дэдпула 2» возникает вопрос, к чьим регенерационным способностям он ближе — саламандры или, возможно, гидры? (И нет, речь не о заклятом враге Капитана Америки.)

Абраамом Трамбле на гидре (гидра, книдарии), Рене Антуаном де Реомюром на ракообразных и Ладзаро Спалланцани на саламандрах, установили стандарт экспериментальной работы и анализа полученных данных (Dinsmore, 1991). Более двух веков спустя мы начинаем находить ответы на великие вопросы регенерации и, возможно, однажды сможем сделать с телом человека нечто, что позволит и нашим конечностям регенерировать.

Определение проблемы регенерации

«Я бы правую руку отдал, чтобы узнать секрет регенерации». Эта цитата из Оскара Шотте (Goss, 1991) передает, насколько притягательной была для науки замечательная способность некоторых организмов к восстановлению. **Регенерация** — это реактивация механизмов развития в постэмбриональном периоде для возмещения поврежденных или утраченных тканей. Для людей овладение регенерационными способностями сулило бы много выгод: удаленные конечности могли бы восстанавливаться; пораженные болезнью органы могли бы вырастать заново после удаления; нервные клетки, измененные с возрастом, болезнью или в результате травмы, могли бы вернуться к нормальной работе. До того как современная медицина сможет добиться регенерации костной или нервной ткани человека, мы должны понять, как регенерация протекает у видов, уже обладающих этой способностью. Знание роли паракринных факторов в формировании органов и умение клонировать гены, кодирующие эти факторы, запустили процесс, названный Сюзан Брайант (1999) «ренессансом регенерации». «Ренессанс» дословно можно перевести

как «возрождение», и, ввиду того что регенерация включает возвращение к эмбриональному состоянию, термин оказался удачным во многих отношениях.

Несмотря на то что в той или иной форме регенерация встречается практически у всех видов, работа с несколькими модельными организмами оказалась особенно плодотворной (**рис. 22.1**). Одни из наиболее невероятных регенерационных способностей можно наблюдать в царстве растений, в котором образование органов *de novo* возможно даже из одной клетки. Не сильно отстают от них по тотипотентным возможностям гидры и планарии, полнота регенерации у которых не имеет себе равных среди животных. Они способны к регенерации законченных органов после ампутации и даже целой особи из очень маленьких фрагментов. Среди позвоночных уникальны некоторые саламандры, способные регенерировать свои конечности, а головастики лягушки часто используют в исследованиях регенерации хвоста и хрусталика глаза. Аквариумная рыбка *Danio* оказалась весьма полезной для исследования механизмов регенерации центральной нервной системы, сетчатки, сердца, печени и плавника. У млекопитающих, хоть они и не способны восстанавливать целые конечности, отдельные ткани и органы обладают тем или иным регенерационным потенциалом; наиболее показательный пример — олени рога. Как это вообще возможно? Раскрыть загадки регенерации — задача чрезвычайно трудная.

У любого организма можно выделить несколько шагов, необходимых для регенерации поврежденной структуры (**рис. 22.2**):

1. Еще до повреждения клетки и ткани должны иметь «представление» о собственной идентичности в составе организма, своей форме и даже положении относительно других клеток тела — «карту морфологической памяти».



Рис. 22.1. Типичные организмы и сравнение их регенерационных способностей. © Michael F. Barresi

2. После повреждения клеткам и тканям организма нужно распознать, что изменилось и чему требуется точное замещение.
3. Организму необходимо быстро среагировать закрытием раны.
4. Начинается настоящий регенерационный ответ. Реализация некоторых механизмов, задействованных в эмбриональном развитии, в регенерации инициирует пролиферацию клеток, рост тканей и реорганизацию клеток с их дифференцировкой в утраченные структуры.
5. Регенерация должна завершиться, когда сформированный регенерат достигнет размера и формы утраченной части и станет не только пропорционален остальному телу, но и интегрируется в него. Можете ли вы представить механизмы, задействованные в этих шагах? Регенерировать не про-

сто, однако некоторые животные мастерски освоили процесс. Регенерация требует системы «осознания» целостности организма на уровне отдельных клеток, взаимодействия с индуцированным раной иммунным ответом и выраженного воспроизведения морфогенеза, прошедшего в развитии.

ВИДЫ РЕГЕНЕРАЦИИ

Несмотря на многочисленные различия между видами в регенерационном потенциале, любой организм, обсуждаемый в этой главе, служит примером одного или нескольких из следующих четырех видов регенерации (**рис. 22.3**):

1. *Регенерация за счет стволовых клеток.* Стволовые клетки позволяют организму вновь выращивать отдельные утраченные органы и ткани, например отращивать волос из стволовых клеток волосяного фолликула и постоянно замещать клетки крови за счет гематопоэтических стволовых клеток костного мозга.
2. *Этиморфоз.* У некоторых видов структуры взрослого организма претерпевают дедифференцировку с образованием массы относительно недифференцированных клеток (бластемы), которая затем редифференцируется в ходе морфогенеза новой структуры. Это характерно для регенерации конечностей амфибий.
3. *Морфаллаксис.* В данном случае регенерация осуществляется за счет перестройки существующих тканей. Рост, если и происходит, то очень ограниченный, преобладают же клеточная гибель и смена клеточного типа (т. е. трансдифференцировка в другой клеточный тип). В результате происходит перестройка и изменение размеров всего тела, а также восстановление утраченной части. Такой тип регенерации лучше всего представлен у гидры.
4. *Компенсаторная регенерация.* В этом случае дифференцированные клетки делятся, но сохраняют свои функции. Новые клетки образуются не из стволовых и не за счет дедифференцировки зрелых клеток. Каждая клетка производит себе подобные, не образуется массы недифференцированной ткани. Такой тип регенерации характерен для печени млекопитающих.

1 Карта морфологической памяти



2 Признание появившихся отличий



3 Закрытие раны



4 Регенерация



5 Прекращение регенерации



Рис. 22.2. Концепция основных шагов регенерации.
© Michael F. Barresi

Регенерация: повторение эмбрионального развития?

Создание и использование стволовых клеток, процессы клеточной пролиферации и дифференцировки, морфогенез тканей — механизмы, лежащие в основе всех затронутых выше режимов регенерации, а также базовые механизмы эмбриогенеза. Так явля-

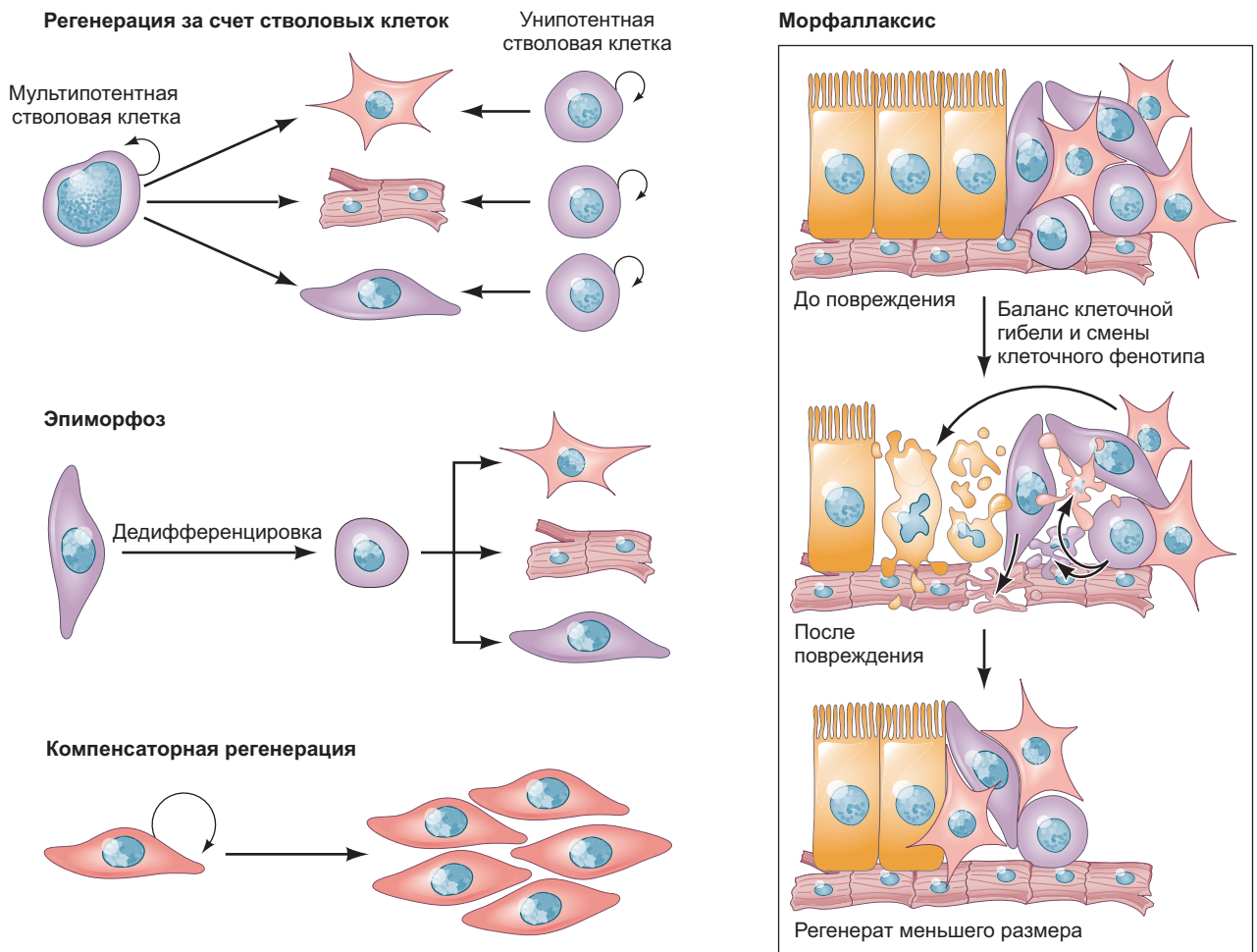


Рис. 22.3. Четыре различных вида регенерации

ется ли регенерация лишь повторением эмбрионального развития (рис. 22.4)? Ответ на большинство вопросов биологии развития неизменно звучит так: «И да, и нет».

К регенерации можно уверенно применить старую поговорку: «Не чини, коли не поломано». Если механизмов, задействованных в ходе эмбриогенеза, было достаточно для построения всех клеток и тканей целого организма, так ли уж необходимо заново изобретать способы для решения такой же задачи в дальнейшей жизни, или постэмбриональная среда накладывает ограничения, требующие новых решений? Ответ на этот часто задаваемый вопрос — да, регенерация при любом удобном случае копирует механизмы эмбриогенеза, и да, регенерация требует адаптации к контексту.

Четыре принципиальных различия между регенерацией и эмбриогенезом не позволяют считать ее строгим воспроизведением эмбрионального развития. Среди них — иммунный ответ, репрограммирование, интеграция и завершение.

1. Иммунный ответ. Наиболее значительное различие между регенерацией и эмбриональным развитием состоит в том, что регенерация — это ответ

на повреждение. Часто его сопровождают травма, некроз, потеря жидкости, наличие оголенных, незащищенных тканей. Иммунный ответ «обращает» первостепенное внимание на закрытие раны и во многих случаях (в зависимости от вида) на привлечение фагоцитирующих клеток для зачистки области повреждения (рис. 22.4; 1а, б).

2. Индукция репрограммирования. После повреждения необходимо активировать клетки (резидентные или отдаленные) до достижения ими незрелого состояния, подобного эмбриональному, после чего они смогут использовать программы развития, нужные для перестройки тканей. Регенерация может использовать новые способы репрограммирования зрелых клеток в эмбриоподобные (рис. 22.4; 2а, б).

3. Системная интеграция. Регенерация зрелых тканей включает образование новых клеток, которые организуются и интегрируются в существующие дифференцированные ткани. Например, сюда входит должная интеграция кровеносных сосудов и нервных контактов (рис. 22.4; 3а, б).

4. Восстановление размера и завершение. Регенерация происходит в соседстве со зрелыми тканями,

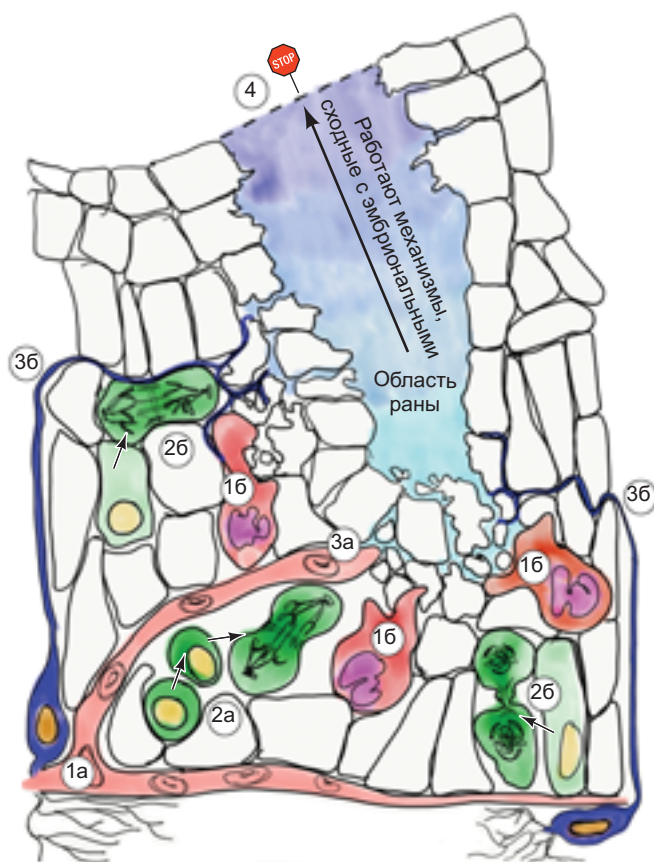


Рис. 22.4. Новинки регенерации. Ранение вызывает в циркуляторном русле (1а) воспалительный ответ, включающий инвазию макрофагов (16). Маленькие черные стрелки указывают последовательные стадии в рамках клеточной линии. Регенерация требует вовлечения стволовых клеток путем активации резидентных мультипотентных стволовых клеток (2а) и/или репрограммирования дифференцированных клеток в прогениторные (26). Необходимы механизмы интеграции новых регенерировавших клеток в существующие ткани, например кровеносные сосуды (3а) и нейроны (36). Когда восстановление тканей запущено, в ходе регенерации должен существовать некий уникальный способ, позволяющий правильно оценить размер регенерата относительно тела и остановиться по достижении корректных пропорций (4). © Michael F. Barresi

которые тем временем функционируют и, возможно, даже растут. Это предполагает потребность в специфических механизмах коммуникации для распознавания пространственных отношений с окружающими тканями и организмом в целом. Кроме того, механизмы должны гарантировать, что рост *de novo* будет адекватно калиброван и остановится по достижении нужного размера.

Исследователи в области регенерации пытаются раскрыть, как работают уникальные для регенерации процессы и как механизмы эмбрионального развития используются для обеспечения хода регенерации. По мере изучения материала этой главы подумайте, как конкретные механизмы регенерации укладываются в две категории: 1) реализация эмбриональных механизмов; 2) ответы, специфичные для регенерации.



Загадки развития

Как зрелые клетки репрограммируются до состояния, близкого к эмбриональному? Что, по вашему мнению, должно произойти, чтобы запустить полное обнуление текущих свойств клетки и получить из нее нечто совершенно новое? Думайте глобально. Имейте в виду окружение. Имейте в виду генетику.



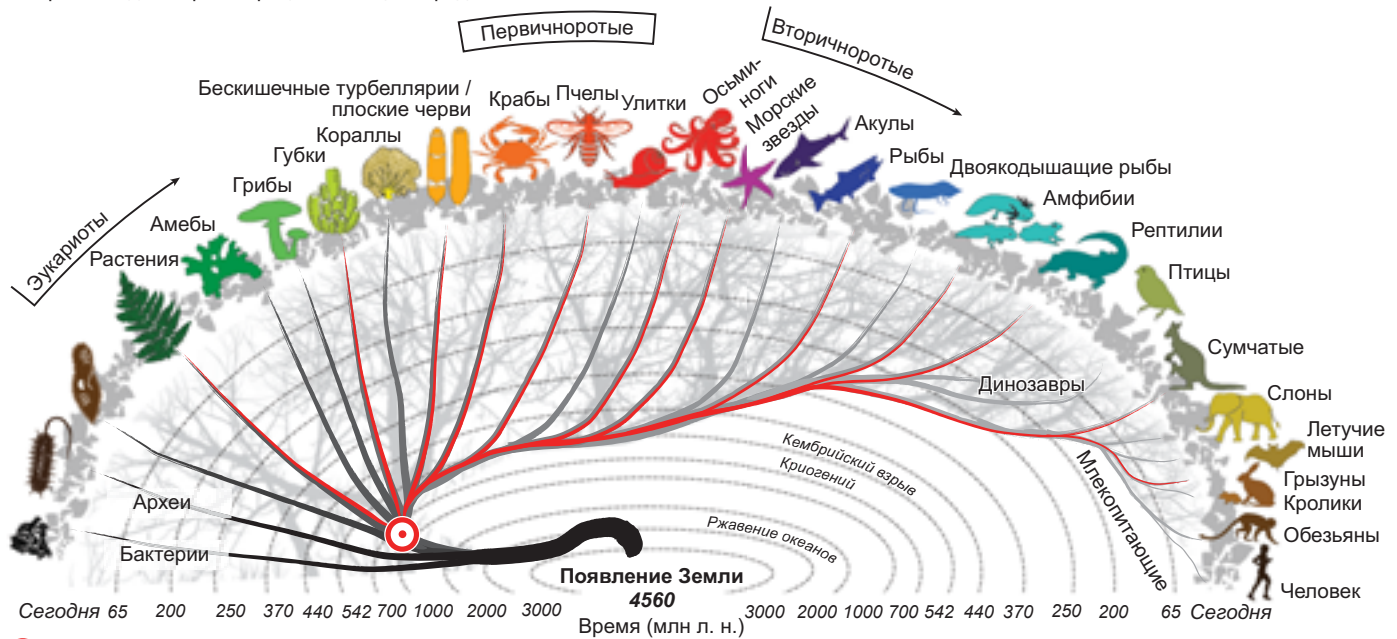
Загадки развития

В силу преимущественного использования модельных систем регенерацию изучали у крайне незначительного числа видов, из-за чего сложно определить, какая из гипотез эволюции регенерации точнее. Как подойти к этой проблеме? Какие виды вы бы выбрали для исследования в первую очередь и как узнать, связана ли эволюционно регенерация одного вида с регенерацией другого?

Эволюционный взгляд на регенерацию

Почему люди не могут отрачивать конечности после ампутации, как саламандры, или восстанавливать поврежденные мозг и сердце, как *Danio*? Такие способности, судя по всему, удел персонажей комиксов и преимущественно водных животных, давно отделившихся от эволюционной линии человека. Способность регенерировать после ранений кажется однозначно адаптивной. Если это так и некоторые наши многоклеточные предки ею обладали, почему предки людей и других млекопитающих потеряли ее

А Происхождение регенерации от общего предка



Б Независимое происхождение регенерации

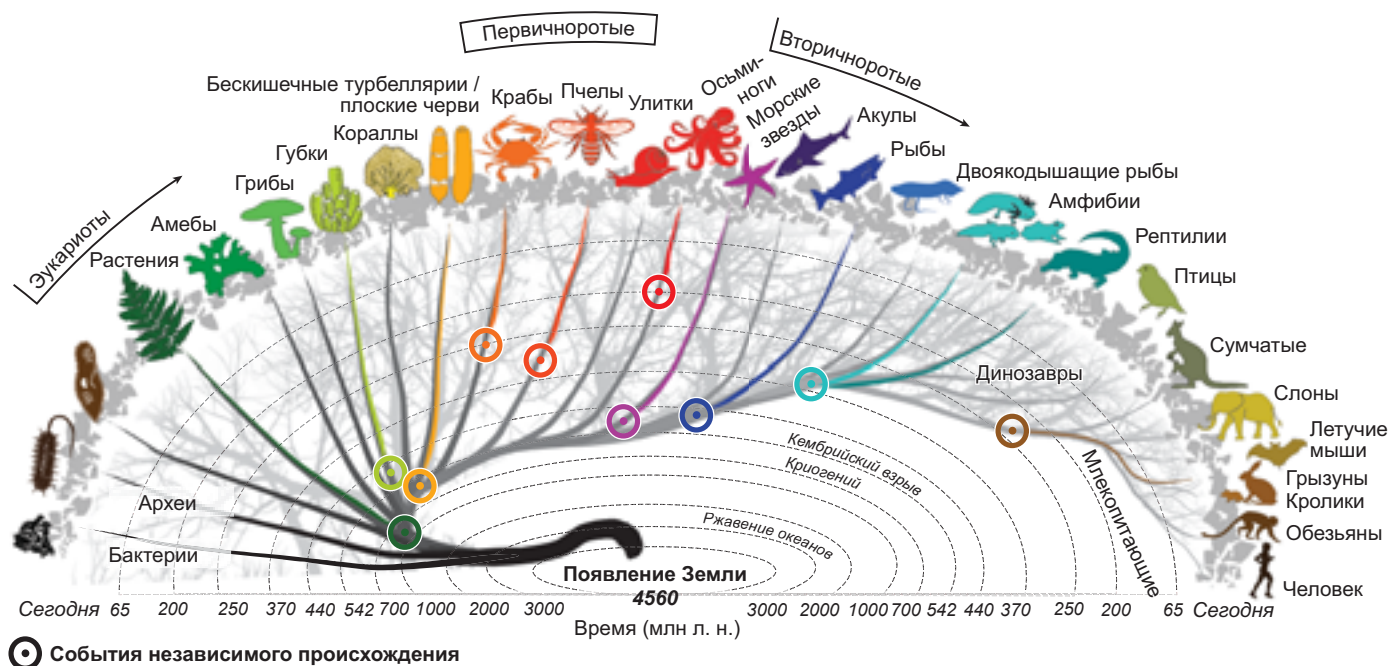


Рис. 22.5. Эволюция регенерации. Схематично представлены два варианта возникновения регенерации, которые не являются взаимоисключающими. **А.** Возникновение регенерации от единого общего предка. Теоретически, этот предок располагается на дереве жизни у основания линии многоклеточных (следуйте за красными линиями от него до производных ветвей). Регенерацией обладают бескишечные турбеллярии и губки, т. е. их общий предок предположительно является предком всех регенерирующих животных. **Б.** В то же время регенерация могла неоднократно возникать путем конвергентной эволюции. © Michael F. Barresi

в ходе эволюции? Возможно, анализируя эволюционную историю регенерации, мы сможем лучше понять, почему сейчас некоторые организмы регенерируют вполне успешно, а другие обладают ограниченными способностями к восстановлению тканей.

Появилось два преобладающих взгляда на эволюцию регенерации (**рис. 22.5**). Как было описано выше, с одной стороны, мог существовать древний предок с обширными регенерационными способностями, часть которых выборочно сохранялась или утрачивалась в ходе эволюционной истории (макроэволюционный эффект). С другой стороны, регенерационные способности могли возникать независимо у разных видов (микроэволюционный эффект), т. е. разошедшиеся линии независимо пришли к изобретению регенерации (имела место **конвергентная эволюция**). Эти две идеи не являются взаимоисключающими; комбинация двух эволюционных эффектов выражалась бы в том, что древний предок передал свои регенерационные способности некоторым, но не всем потомкам, в то время как независимые линии одновременно развили собственные механизмы регенерации.

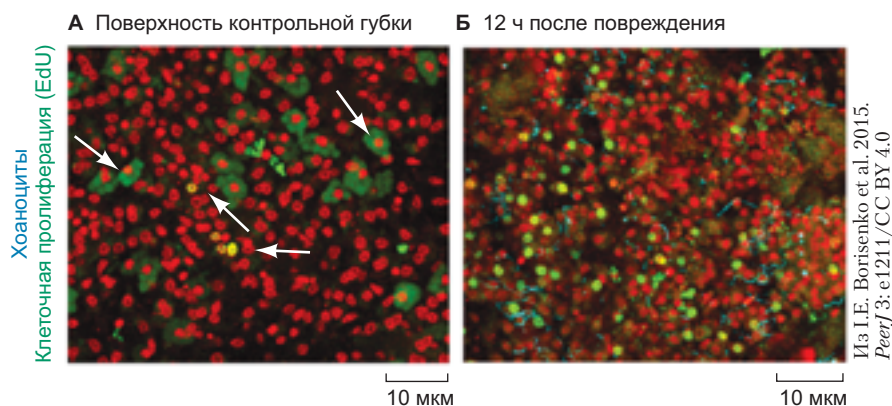
Исследователи еще не определили, существовали ли когда-то единый регенерирующий предок, или же регенерация является продуктом конвергентной эволюции, однако регенерирующие виды широко представлены в царствах растений и животных. Растения, как было показано, способны регенерировать целиком из отдельных культивируемых клеток — т. е. эти клетки тотипотентны. Еще важнее, что регенерационные способности растений разнообразны: и полная регенерация тела у зеленых водорослей, и воссоздание меристем у некоторых мохообразных (например, печеночников), и, в зависимости от типа повреждения, полная регенерация побега или корня у семенных растений. Таким образом, большая часть царства растений сохранила обширные регенерационные способности в ходе эволюции. С точки зрения естественного отбора это вполне понятно. Растения в основном неподвижны — они не могут убежать от хищника или укрыться, будучи ранеными. Поэтому в их случае имеет смысл развитие чрезвычайной пластичности в способностях к заживлению, восстановлению и замещению тканей.

По сравнению с царством растений, по эволюционному древу животных регенерация распределена менее равномерно. Если способность к регенерации пришла от общего предка, можно ожидать, что современные виды, чьи линии рано от него отделились и мало менялись, сохранили похожие регенерационные способности. Как отмечено выше, планарии являются одними из наиболее хорошо изученных и впечатляющих примеров регенерации всего тела. Напоминающая планарий клада бескишечных турбеллярий, обладающая сравнимыми регенерационными способностями, отделилась от других билатерально симметричных животных 550 млн лет

назад (**рис. 22.5А, желтая линия**). Как и планарии, сегодняшние бескишечные турбеллярии способны к полной регенерации после ампутации половины тела, и идет она так же за счет стволовых клеток, называемых необластами (De Milder et al., 2009; Raz et al., 2017). Еще более впечатляет то, что их регенерационный процесс зависит от сигнального пути Wnt, как и регенерация разных билатерально-симметричных животных (Srivastava et al., 2014). Эти данные однозначно указывают, что подлежащие молекулярные и клеточные механизмы регенерации, вероятно, присутствовали уже у общего предка всех билатерий.

Если регенерация и правда была присуща урбилатерии (как называют этого гипотетического предка), насколько далеко назад могут уходить истоки восстановительного поведения? Как было отмечено в гл. 1 (см. **рис. 1.20 и 1.25**), губки, возможно, наиболее близки эволюционному корню всех животных. Интересно, что факт наличия у них регенерации был обнаружен больше века назад (Wilson, 1907), однако в полной мере восстановительные способности губок и лежащее в их основе клеточное поведение только начинают изучать (Adamska, 2018; Funayama, 2018). Некоторые губки (классы Homoscleromorpha, Demospongia, Calcarea, Hexactinellida) проявляют замечательную, максимальную среди всех изученных животных способность к регенерации всего тела. Взрослые особи некоторых видов могут не только полностью регенерировать ткани тела после удаления больших частей, но и полностью восстанавливают особь из диссоциированных клеток! Перед нами животное, по регенерационным способностям соответствующее растениям с их тотипотентностью. Диссоциированные клетки минимум двух видов (*Spongilla lacustris* и *Haliclona cf. permolis*) оказались способны к формированию агрегатов, корректной сортировке клеток, удалению дебриса, прикреплению к субстрату и завершению дифференцировки клеток в функционально организованные ткани губки. Важно, что тотипотентность не очень распространена среди губок, но все они явно обладают обширными регенерационными способностями (Eerkes-Medrano et al., 2015). Недавние открытия говорят в пользу модели, в которой минимум два клеточных типа, хоаноциты и археоциты, действуют как плюрипотентные стволовые клетки, представляя большую часть материала для регенерации (**рис. 22.6**). Кроме того, эти же клеточные типы наряду с другими эпителиальными клетками проходят трансдифференцировку для прямого возмещения утраченных тканей (Borisenko et al., 2015; Ereskovsky et al., 2015, 2017); и как минимум у одного вида *Halisarca dujardini* на месте повреждения образуется бластемоподобная структура. У этого вида хоаноциты реагируют на повреждение эпителио-мезенхимным переходом и миграцией в рану. Там они смешиваются со столь же недифференцированными производными

Рис. 22.6. Хоаноциты губок пролиферируют в ответ на повреждение. Пролиферирующие клетки в S-фазе мечены EdU, 5-этинил-2'-деоксиуридином (*зеленый*); хоаноциты мечены антителами к тубулину (*синий*); красная флуоресценция маркирует все ядра. **А.** Неповрежденный контроль. **Б.** Вовлечение и усиленная пролиферация хоаноцитов на поверхности раны



близлежащих археоцитов и образуют пролиферирующую массу, которая служит источником регенерации поврежденной ткани (Borisenko et al., 2015). Такой тип клеточного ответа явно основан на механизме регенерации с помощью бластемы, который можно наблюдать у регенерирующих представителей разных типов животных. Таким образом, ныне живущие потомки организмов, раньше всего отделившихся от общего предка животных, губки, демонстрируют три из существующих режимов регенерации: регенерацию за счет стволовых клеток, морфаллаксис (или трансдифференцировку) и эпиморфоз (образование бластемы).



Загадки развития

Если существует единый общий предок всех регенерирующих организмов, как вы считаете, насколько давно возникла регенерация? Мы предположили, что регенерация уходит корнями к предкам бескишечных турбеллярий и губок, но, возможно, ее истоки лежат в основании многоклеточности или в какой-то мере даже заложены в поведение одноклеточных эукариот? Одноклеточная (ресничная) инфузория стентор способна к регенерации! Мог ли наш одноклеточный предок регенерировать?

ПОЧЕМУ СУЩЕСТВУЕТ ТАК МНОГО ЖИВОТНЫХ, НЕ СПОСОБНЫХ К РЕГЕНЕРАЦИИ?

Так звучит самый часто задаваемый биологам развития вопрос. Когда сомневаешься — вини естественный отбор. Различия в регенерационных способностях могут быть связаны с набором поведенческих вариантов, доступных подвижным животным для избегания хищников или угрожающих жизни последствий потери крови. Далее вы узнаете, что образование шрама, заживляющее рану, в то же время чрезвычайно эффективно ингибирует процесс регенерации. Согласно одной гипотезе, объясняющей, зачем животным рубцы, ингибирующие регенерацию,

быстрое образование рубца порой больше способствует выживанию, чем медленный процесс регенерации. Рассудите так: в случае угрожающего жизни ранения не важнее ли предотвратить немедленную смерть от потери крови, чем медленно восстановить утраченную конечность? Исследователи в области регенеративной медицины в настоящий момент пытаются расшифровать механизмы, которые определяют, будет повреждение заживать за счет образования рубца или за счет регенеративного ответа, в надежде найти способы вмешательства, индуцирующие регенерацию.

Хотя дальше мы узнаем о роли внеклеточного матрикса в балансе между образованием рубца и заживлением путем регенерации, наша гипотеза сама по себе не является удовлетворительным ответом на более масштабный вопрос о том, почему способности к регенерации могли быть снижены в ходе эволюции. Интригует тот факт, что с некоторыми исключениями (регенерирующие рога оленя) лучшие регенераторы живут преимущественно в водной среде. Какую роль играет, если играет, вода в процессе регенерации? Скорее всего, множество эволюционных компромиссов внесли вклад в уменьшение регенерационных способностей; таким образом, существование единственного ответа кажется маловероятным. Тем не менее обращение к этим вопросам поднимает исследование регенерации на новые высоты. Сегодняшним студентам особенно повезло быть частью этого ренессанса регенерации, во время которого ко многим фундаментальным вопросам обращаются впервые. Чтобы исследовать и ответить на них продуктивно, необходимо прежде разобраться в текущем понимании механизмов, движущих различные регенеративные процессы.

Механика регенерации

Мы уже описали режимы регенерации у разных организмов — от восстановления всего тела до заживления в пределах органов и тканей. Какие механизмы развития стоят за регенерационными способностями у животных и растений и есть ли у них общие черты?

Ответ на последний вопрос — да, несколько. Стволовые клетки, контроль клеточного цикла, морфогены и состав внеклеточного матрикса — ключевые повторяющиеся элементы.

Регенерация у растений

Тотипотентный способ регенерации

Если вам случалось косить газон, вы хорошо знаете способность растений непреклонно отрастать вновь и вновь. Еще более изумительна регенерация растений из изолированной части; положите основание, отрезанное от пучка сельдерея, в воду, и оно пустит новые корни и побеги (рис. 22.7). К счастью для астронавта и ботаника Марка Уотни из «Марсианина», кусочки картофеля, помещенные в почву, тоже могут регенерировать до новых растений (смотри снятую в 2015 г. адаптацию книги Энди Вейера). Регенерационные стратегии растений очень разнообразны, и многие из них были открыты в сельском

хозяйстве. Здесь мы сосредоточимся на основных режимах регенерации, встречающихся в природе и демонстрирующих поразительное сходство с механизмами регенерации у животных, несмотря на независимость их эволюции. Эти режимы включают период репрограммирования клеток, создание тотипотентных клеток и последующее формирование органов растения, организованных на основании позиционной информации.

РЕГЕНЕРАЦИЯ ОДНОЙ КЛЕТКИ ЗА СЧЕТ ОДНОЙ КЛЕТКИ

Водоросль *Acetabularia* известна также как «бокал русалки» благодаря своей форме — чашевидной структуре, стоящей на центральной ножке высотой около 6 см, которая часто крепится к морским камням ризоидами (рис. 22.8). Замечательно, что каждая ацетабулярия — единственная клетка! Именно так: у нее одна клеточная мембрана, покрывающая весь организм, и на протяжении большей части жизни ацетабулярия содержит лишь одно ядро, расположенное в базальной части клетки. Еще удивительнее то, как этот «бокал» регенерирует новую «чашу» из ножки.

В 1940-х, когда еще не сформулировали центральную догму молекулярной биологии (ДНК — РНК — белок), Иоахим Геммерлинг обнаружил, что, если базальную часть клетки ацетабулярии перерезать (сохранив в ней ядро), она всегда остается способной к регенерации чаши. Чем апикальнее проходил разрез, тем более апикальными структурами ограничивалась регенерация (Mandoli, 1998). Эксперименты Геммерлинга подготовили почву не только для открытия мРНК, но и для признания важности позиционной информации вдоль апикально-базальной оси для кор-



© Michael F. Barresi

Рис. 22.7. Разрез, вода и солнечный свет — все, что нужно для наблюдения регенерации растения. Автор Майкл Барреси отрезал основание пучка сельдерея и поместил его в водопроводную воду. В течение недели из центральной мутовки появились новые побеги



С разрешения: Alphonse Ralph Cavalliere, Университет Лейтисберга

Рис. 22.8. Водоросль *Acetabularia*, или «бокал русалки». На фото — шесть отдельных особей. Это растение может регенерировать верхнюю часть из нижней. Что в этом удивительного? Все растение — одна клетка!

ректной организации регенерирующего организма — будь это единственная клетка или, как вы скоро увидите, многоклеточное животное или растение.

РЕГЕНЕРАЦИЯ ЦЕЛОГО РАСТЕНИЯ ЗА СЧЕТ ОДНОЙ КЛЕТКИ

Эволюция многоклеточных эмбриофитов началась с формирования многоклеточных колоний зеленых водорослей, и о ней важно помнить, размышляя о регенерации растений. Нас не должно удивлять, что обычные зеленые водоросли вроде *Bryopsis plumosa* могут регенерировать целые клетки из субпротопластов (сгустков цитоплазмы без клеточной мембраны или клеточной стенки), а также целые водорослевые пласты из отдельных (хоть и многоядерных) клеток (рис. 22.9; Kim et al., 2001). Наземные растения, однако, выработали собственные, более сложные тотипотентные источники регенерации. В подходящих условиях культивирования отдельные зрелые клетки растения или экспланты из специфических дифференцированных тканей могут претерпевать репрограммирование с образованием тотипотентного **каллуса** (неорганизованной массы преимущественно недифференцированных клеток), который далее под действием гормонов развивается в побеги и/или корни. Одни из первых примеров такой способности растений были получены в экспериментах на моркови и табаке (Steward et al., 1958; Vasil and Hildebrandt, 1965; Birnbaum and Sanchez Alvarado, 2008).

Механизмы, опосредующие **регенерацию *de novo*** (т. е. регенерацию из маленьких фрагментов ткани в условиях культивирования) органов растений, весьма зависят от некоторых гормональных сигнальных путей, задействованных в эмбриогенезе, особенно от пути ауксина (см. рис. 4.32) и цитоки-

нина. Для формирования каллуса необходимо перенасыщение среды ауксином. Далее использование определенных соотношений концентрации ауксина и цитокинина позволяет контролировать тип ткани, формирующийся из каллуса. Высокое соотношение концентраций ауксина и цитокинина способствует развитию корней, в то время как противоположное (высокое соотношение концентрации цитокинина и ауксина) способствует развитию побегов (Skoog and Miller, 1957; Su and Zhang, 2014). Таким образом, центральные механизмы развития, исходно строящие эмбрион, в существенной степени повторяются в ходе регенерации взрослого растения.

Чудесные целительные силы меристемы растений

Как вы уже знаете, рост растений неограничен. Сохранение меристемных тканей позволяет им упорно продолжать развитие в течение всей жизни. Меристемы растений чудесны в том смысле, что могут создавать все возможные органы из самоподдерживающейся недифференцированной массы стволовых клеток. Таким образом, при повреждении растение может воспользоваться существующими апикальными меристемами побега и корня, чтобы образовать новые клетки для регенерации. Но что происходит, если ранение сопровождается потерей одной из меристем растения, например при обгрызании хищником или уничтожении лазером исследователя? Как мы помним, растительные клетки не могут мигрировать по организму, как это делают мезенхимные клетки животных. Таким образом, у клеток в зоне раны есть две возможности (рис. 22.10):

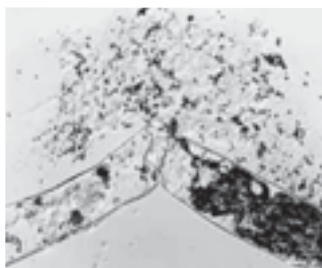
1) они могут регенерировать утраченную ткань *непрямым* путем, *вначале сформировав новую меристему*

А *Bryopsis plumosa*

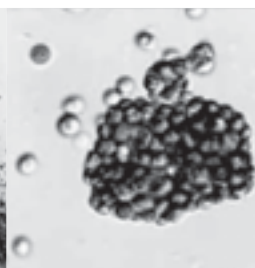


Фото: Courtney Jariak

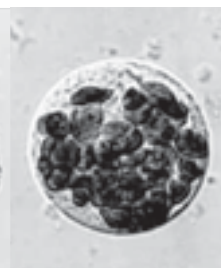
Б



В



Г



Регенерация

Из: G.H. Kim et al., 2001.
J Cell Sci 114: 2009–2014

Рис. 22.9. Регенерация *Bryopsis plumosa*. А. Эта зеленая водоросль представляет собой единственную огромную многоядерную клетку. Б–Г. Интактные протопласты могут регенерировать из сгустков цитоплазмы. Б. Поврежденная клетка, содержимое которой вытекает в окружающую среду. В. Сгусток органелл. Г. Сгусток органелл, восстановивший первичную оболочку всего через 20 мин после повреждения. Позже этот субпротопласт регенерирует настоящую клеточную мембрану

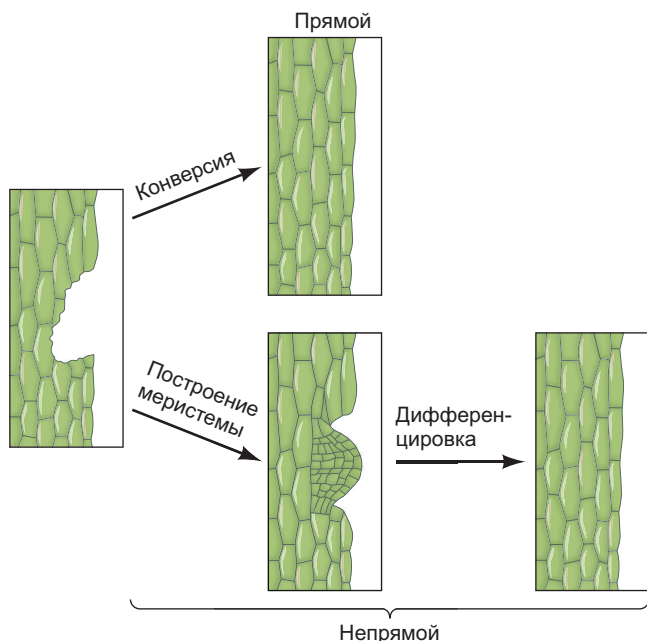


Рис. 22.10. Прямой и непрямой пути регенерации растений. Обратите внимание, что это упрощенное представление возможностей растения после повреждения. Непрямой путь часто проходит через образование каллуса, а после — меристемы, которая дает начало корням и побегам

стему, которая способна дать начало требуемым типам тканей;

- 2) другой возможный подход к регенерации — *прямой*, через *трансдифференцировку* (прямое превращение) в утраченные клеточные типы.

Каждая ли клетка растения способна таким образом отвечать на повреждение? Недавно было показано, что не все клетки обладают компетентностью к формированию тотипотентного каллуса. Вместо этого после повреждения резидентные **стволовые клетки зрелого организма** активируются для инициации прямого или непрямого регенерационного ответа. Говоря конкретнее, в корне *A. thaliana* в качестве зрелых стловых клеток выступают **перицикл** и **прокамбий** (рис. 22.11; Sugimoto et al., 2010; Liu et al., 2014; Jouannet et al., 2015; Kareem et al., 2016a, b). Прокамбий играет ключевую роль меристемы в эмбриогенезе сосудистых растений, как и клетки перицикла, расположенные между эндодермисом и стелой (сосудистыми тканями) корня. В постэмбриональном периоде зрелые стловые клетки считаются частично дифференцированными. Например, зрелые стловые клетки перицикла экспрессируют гены, характерные для их типа ткани и расположения, однако сохраняют и экспрессию генов, связанных с инициацией развития боковых корней. При ветвлении корня зрелые стловые клетки перицикла образуют новую апикальную меристему, дающую начало боковому корню. Способность зрелых стловых клеток инициировать програм-

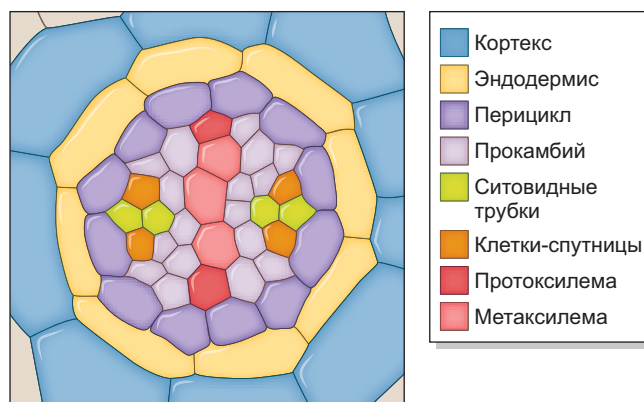


Рис. 22.11. Клетки перицикла и прокамбия — зрелые стловые клетки растения. Изображение поперечного среза корня *Arabidopsis thaliana*. (По данным: Miyashima et al., 2013. *EMBO J* 32: 178–193.)

му развития бокового корня, в ходе которой клетка вновь вступает в клеточный цикл и порождает новые мультипотентные клетки, должна означать, что они сохраняют и потенциал к развитию каллуса, дифференцирующегося в ткани корней и побегов.

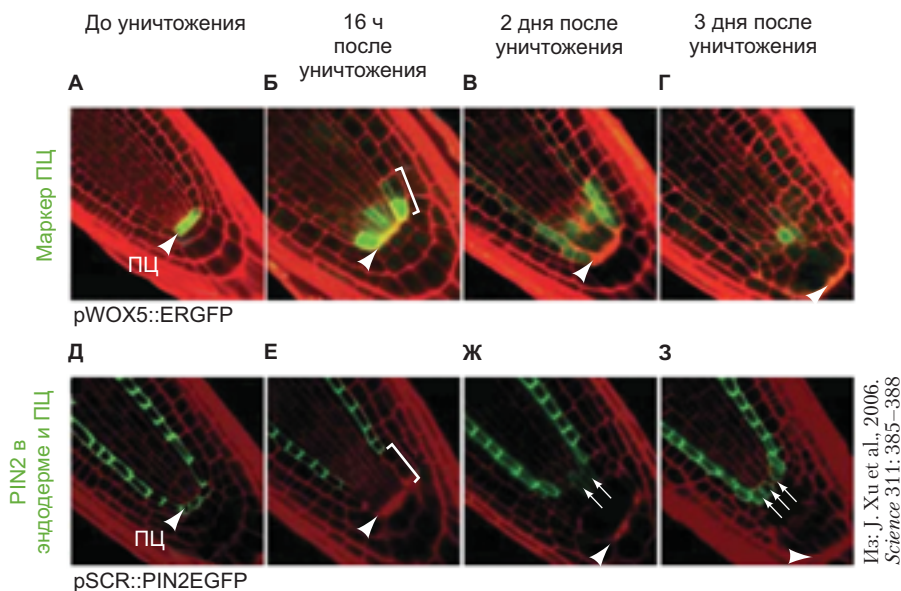
ОТ РАНЕНИЯ К ФАКТОРАМ ТРАНСКРИПЦИИ И РАЗМЕТКИ

Повреждение растения вызывает немедленное нарушение распределения гормона ауксина, что ведет к каскаду событий, поддерживающих образование новой меристемы и последующую регенерацию. К примеру, прицельное уничтожение покоящегося центра (ПЦ) апикальной меристемы корня меняет восприимчивость близлежащих клеток к ауксину, что вскоре приводит к активации генов, нужных для регенерации ПЦ. Гены транскрипционных факторов семейства PLETHORA (PLT), которые тоже задействованы в развитии апикальной меристемы корня, первыми индуцируются вблизи места повреждения. Транскрипционные факторы PLT активируют экспрессию *SHORTROOT* (*SHR*) и далее *SCARECROW* (*SCR*) (рис. 22.12). Важно, что экспрессия генов этой сети приводит к перераспределению мембранных транспортеров PIN, перенаправляющих ток ауксина вдоль апикально-базальной и медиально-латеральной осей, который способствует формированию ПЦ и корректному образованию органов.

PLT и SCR вместе взаимодействуют с растительным вариантом транскрипционного фактора PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Shimotohno et al., 2018)¹. PCNA уже давно известен участием в кон-

¹ Конкретнее, речь идет о транскрипционном факторе TCP20, члене класса I белков TCP (teosinte-branched cycloidea PCNA), напрямую взаимодействующем с PLT и SCR (Shimotohno et al., 2018).

Рис. 22.12. Демонстрация динамики регенерации покоящегося центра (ПЦ) в апикальной меристеме кончика корня *Arabidopsis thaliana*. **А–Г.** Треугольниками отмечено положение уничтоженного ПЦ. Он визуализирован экспрессией зеленого флуоресцентного белка GFP под промотором *pWOX5*. Скобка на рис. Б показывает расширение зоны экспрессии маркера ПЦ. **Д–З.** Визуализация положения PIN2 в клетках эндодермы. Конструкт PIN2:GFP экспрессируется под промотором *pSCR* (зеленый). Скобка на рис. Е отмечает утрату экспрессии PIN2, а стрелки на рис. Ж и З указывают на ее возобновление в клетках, относящихся к новообразованному регенерату ПЦ



троле клеточного цикла и клеточной пролиферации у самых разных организмов — от дрожжей до людей и растений (Strazalka and Ziemienowicz, 2011; Li, 2015). Таким образом, взаимодействие PLT с PCNA подсказывает механизм вовлечения дифференцированных клеток в клеточный цикл для инициации регенеративного ответа — механизм, который служит примером глубокой гомологии между регенеративными путями у животных и растений.

КАНАЛИЗАЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ СОСУДОВ

Будучи сосудистыми тканями, ксилема и флоэма являются критически значимыми структурами, необходимыми для быстрого восстановления после повреждения. Действительно, разрез сосудистых тканей стебля растения вызывает образование новых связей между сосудистыми путями выше и ниже места разреза. Интересно, что удаление побегов и листьев над порезом предотвращает регенерацию ксилемы и флоэмы. В то же время, если нанести экзогенный источник ауксина на поврежденный стебель или ветку, регенерация сосудистых тканей восстанавливается (рис. 22.13). Из этих результатов следует, что для инициации полноценного восстановления сосудистой системы достаточно апикального источника ауксина. Дифференцировка сосудов начинается в месте нане-

сения ауксина, а после распространяется базальнее, клетка за клеткой, пока они не придут в контакт с существующими сосудами. Эта цепь клеток-предшественников сосудов направляет (канализирует) ток ауксина к нижележащим недифференцированным клеткам, поддерживая регенерацию ксилемы. Такой характер регенерации отразился в **модели канализации** развития сосудов, согласно которой, сосуды над заживающей раной или развивающейся тканью служат источником ауксина, а регенерирующий (или развивающийся) тяж расположенных ниже дифференцирующихся клеток служит поглотителем ауксина (Bennett et al., 2014). В итоге, как поток воды может сформировать новое русло реки, сигнальный путь ауксина «вырезает» новый канал, по которому вновь пойдет ток воды в растении.

Модель канализации основана на том, что сигнальный путь ауксина способен самоорганизовываться в паттерн, ведущий к корректному расположению сосудов. Достигая клетки, ауксин вызывает асимметричное перераспределение своих транспортеров к ее базальной части, направляя выброс ауксина в сторону нижележащей клетки. Чем больше клеток вовлекается в процесс, тем более мощным и направленным получается ток ауксина. В итоге образуется канал дифференцировки сосудов. Как показано на рис. 22.13, этот механизм начинается с быстрого ауксинового ответа над повреждением и вокруг него. За ним сле-

Рис. 22.13. Ауксин-зависимая регенерация ксилемы. **А.** Последовательность индуцирующих событий в ходе регенерации сосудистого камбия после повреждения побега *Arabidopsis thaliana*. **Б.** Чувствительный к ауксину репортер (синий) стремительно наращивает экспрессию над раной и вокруг нее. Фотографии побега на протяжении первых дней после ранения. Звездочкой отмечено место первого появления активности репортера. **В.** В клетках вокруг раны меняется полярность распределения PIN1, что перераспределяет транспорт ауксина в обход раны и в направлении существующих сосудистых тканей. На микрофотографиях показана красная флуоресценция меченого белка PIN1; белые стрелки показывают полярность PIN1; пунктирной

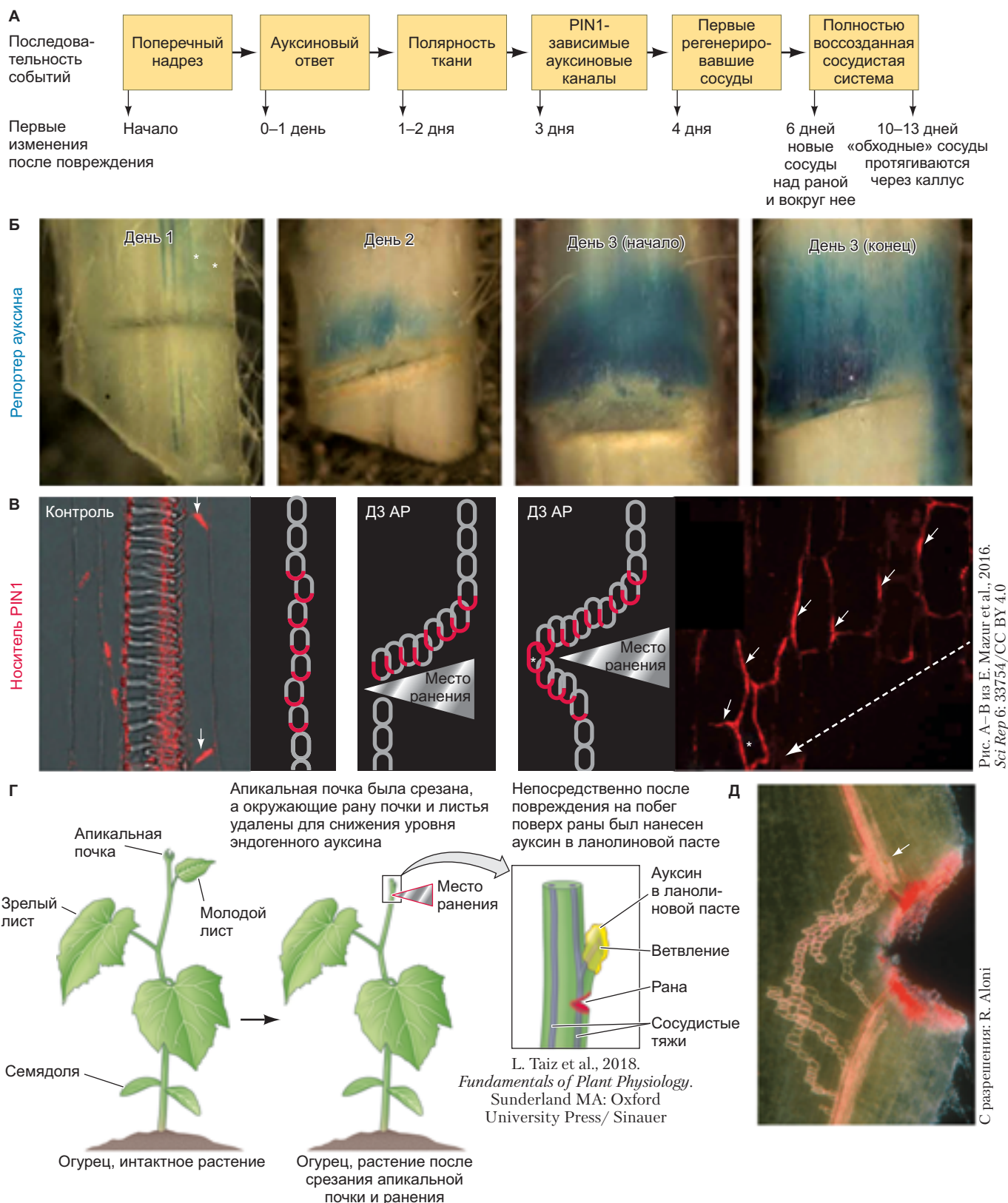


Рис. А–В из E. Mazur et al., 2016. *Sci Rep* 6: 33754/CC BY 4.0

С разрешения: R. Aloni

стрелкой отмечено положение раны. На схеме показано положение PIN1 (красное выделение) в клеточных мембранах контрольного и раненого растения; треугольники указывают на место ранения, а звездочкой отмечена клетка у края раны. Г. Схема эксперимента по повреждению стебля огурца с дополнительным удалением листьев и побега над раной для устранения всех источников эндогенного ауксина. Д. Экзогенное нанесение ауксина индуцирует регенерацию сосудов, визуализированных на фотографии розовой флуоресценцией

дует перераспределение ауксиновых транспортеров PIN1 к базальным и латеральным сторонам дифференцирующихся клеток, что направляет ток ауксина вокруг раны. В конце концов новые сосудистые тяжи обходят повреждение и соединяются с существующими сосудистыми тканями (Mazur et al., 2016).



Загадки развития

Можно считать установленным тот факт, что эпигенетические модификации играют роль в регенерации растений, но как она инициируется? При повреждении растения быстрое изменение хроматина способствует репрограммированию, но как именно? Какой именно аспект повреждения запускает эпигенетические изменения, определяющие благоприятное для регенерации состояние клеток?

Регенерация всего тела у животных

Гидра: регенерация за счет стволовых клеток, морфаллаксис и эпиморфоз

«Да не будем мы уничтожены! Отрежь конечность — еще две да займут ее место!.. Да будет Гидра!» (Странные Истории, комиксы Марвел). Как и вымышленная террористическая организация, настоящие гидры¹, пресноводные стрекающие, — просто супергерои по части регенерационных способностей. Большинство из них крошечные — около 5 мм в длину. Тело гидры радиально симметричное и представляет собой трубку с «головой» на дистальном конце и «подошвой» на проксимальном. «Подошва», или **базальный диск**, позволяет животному крепиться к камням или нижним сторонам прудовых растений. «Голова» состоит из конической области **гипостома**, включающей рот и кольцо щупалец (ловящих добычу) под ним. Гидры — двуслойные животные, обладающие только эктодермой и энтодермой (рис. 22.14А). Два их эпителиальных слоя называют **миоэпителием**, так как они обладают свойствами и эпителиальных, и мышечных клеток. Несмотря на отсутствие настоящей мезодермы, у гидры есть секреторные клетки, гаметы, стрекательные клетки (нематоциты) и нейроны, не входящие ни в один из эпителиальных слоев (рис. 22.14Б; Li et al., 2015). Гидры могут размножаться половым путем, но делают это только в неблагоприятных условиях (вроде большой скученности или холодов). Обычно они

предпочитают бесполой способ, отпочковывая новые особи. Почка образуется примерно на уровне одной трети высоты тела от основания.

РУТИННОЕ ЗАМЕЩЕНИЕ КЛЕТОК ТРЕМЯ ТИПАМИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Тело гидры нельзя назвать стабильным. У человека и мухи, например, мы не ожидаем, что клетка кожи с туловища станет мигрировать и слущится с лица или ноги, но у гидры именно это и происходит. Клетки колонки тела постоянно проходят митозы и в итоге вытесняются к одному из ее концов, откуда и сбрасываются (рис. 22.14Б; Campbell, 1967a, b). Таким образом, каждая клетка играет несколько ролей в зависимости от своего возраста, и сигналы определения клеточного развития должны быть постоянно активны. В определенном смысле, тело гидры всегда регенерирует.

Замещение клеток осуществляется тремя клеточными типами. Энтодермальные и эктодермальные клетки являются унипотентными предшественниками, которые непрерывно делятся с образованием такого же эпителия с ограниченными потенциями. Третий тип клеток — мультипотентные **интерстициальные** (промежуточные) **стволовые клетки** в составе эктодермального слоя (рис. 22.14Б). Они производят нейроны, секреторные клетки, нематоциты и гаметы. Наиболее активно все три клеточных типа делятся в центральной части тела, после чего перемещаемый миоэпителий и мигрирующие потомки интерстициальных клеток движутся к апикальному и базальному концу и там дифференцируются (Buzgariu et al., 2015). По сравнению с миоэпителиальными стволовыми клетками (энтодермы и эктодермы), интерстициальные стволовые клетки дольше задерживаются в G₂-фазе клеточного цикла, а остальные фазы проходят быстрее (Buzgariu et al., 2014), предположительно удерживаясь в состоянии готовности немедленно среагировать на потребность в замещении клеток путем быстрой пролиферации. Этих трех клеточных типов достаточно, чтобы построить тело гидры, и если ее клетки разделить и реагрегировать, сформируется новая гидра (Gierer et al., 1972; Technau et al., 2000; Bode 2011).

АКТИВАТОР ГОЛОВЫ

Можно сказать, что экспериментальная эмбриология (более того, экспериментальная биология) началась с изучения Трембле регенерации у гидры. В 1741 г. ученый докладывал, что «история Феникса, возрождающегося из пепла, как бы поразительна она ни была, предлагает не больше чудесного, чем открытие, о котором мы сейчас поведаем». Он обнаружил, что при разрезании гидры на 40 частей они возрождаются в виде множества целых особей, схожих

¹ *Hydra* — одновременно родовое название и бытовое обозначение животного в английском языке. Для простоты в данном издании используется бытовой вариант, без выделения курсивом.

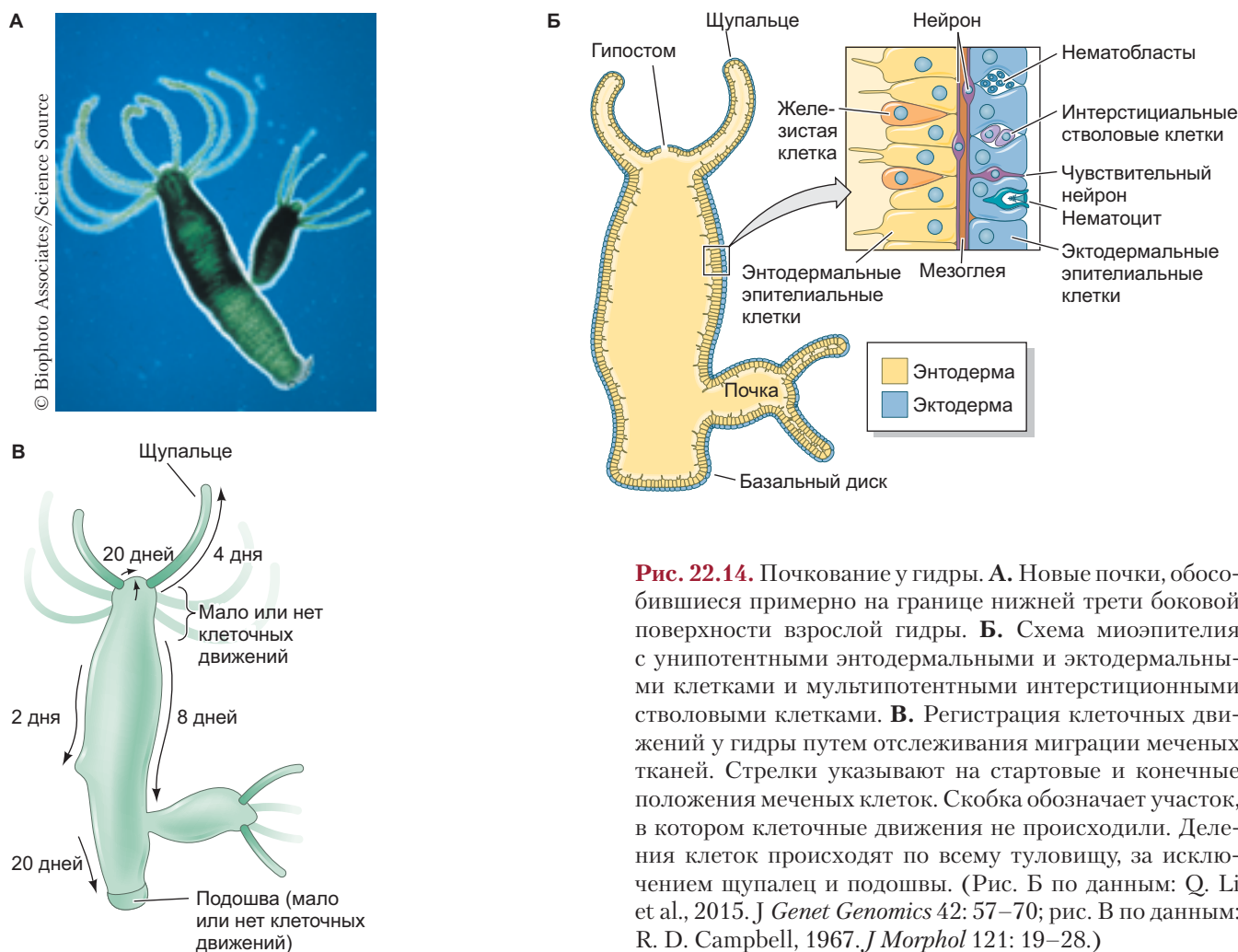


Рис. 22.14. Почкование у гидры. **А.** Новые почки, обособившиеся примерно на границе нижней трети боковой поверхности взрослой гидры. **Б.** Схема миоэпителия с унипотентными энтодермальными и эктодермальными клетками и мультипотентными интерстиционными стволовыми клетками. **В.** Регистрация клеточных движений у гидры путем отслеживания миграции меченых тканей. Стрелки указывают на стартовые и конечные положения меченых клеток. Скобка обозначает участок, в котором клеточные движения не происходили. Деления клеток происходят по всему туловищу, за исключением щупалец и подошвы. (Рис. Б по данным: Q. Li et al., 2015. *J Genet Genomics* 42: 57–70; рис. В по данным: R. D. Campbell, 1967. *J Morphol* 121: 19–28.)

с первой. Каждый кусочек регенерирует голову с той стороны, что была апикальной, и подошву с той, что была базальной.

Каждый участок тела гидры вдоль апикально-базальной оси потенциально способен формировать и голову, и подошву. В то же время полярность животного координирует серия морфогенетических градиентов, позволяющих голове формироваться только в одном месте, а базальному диску — в другом. Свидетельства в пользу наличия таких градиентов впервые были получены в экспериментах с пересадками, начатых Этель Браун в начале 1900-х. Когда ткань гипостомы одной гидры трансплантируют на середину другой, она формирует новую апикально-базальную ось с направленным вперед гипостомом (рис. 22.15А). Когда базальный диск пересаживают на середину гидры-хозяина, тоже формируется новая ось, но с противоположной полярностью — с направленным вперед базальным диском (рис. 22.15Б). Если ткани с обоих концов одновременно пересаживают на середину гидры-хозяина, новая ось либо не возникает вовсе, либо имеет невыраженную полярность (рис. 22.15В; Browne, 1909; Newman, 1974). Эти эксперименты были интерпретированы в пользу

существования **градиента активации головы** (с максимумом в гипостоме) и **градиента активации подошвы** (с максимумом в базальном диске). Градиент активации головы можно измерить путем вживления колец ткани с разных уровней гидры-донора в определенную область тела хозяина (Wilby and Webster, 1970; Herlands and Bode, 1974; MacWilliams, 1983b). Чем выше уровень активатора головы в ткани донора, тем больший процент имплантов индуцирует формирование новых голов. Концентрация фактора активации головы максимальна в гипостоме и линейно снижается по мере приближения к базальному диску.

Гипостом как организатор. Этель Браун (1909; см. также Lenhoff, 1991) отмечала, что гипостом действует как «организатор» гидры. Это мнение было подтверждено Броуном и Бодом (Broun and Bode, 2002), показавшими, что: 1) при трансплантации гипостом может индуцировать ткань хозяина к формированию вторичной оси тела; 2) гипостом производит сигнал активации головы; 3) гипостом является единственной «самодифференцирующейся» частью гидры; 4) гипостом производит также сигнал ингибирования головы, подавляющий формирование новых центров организации.

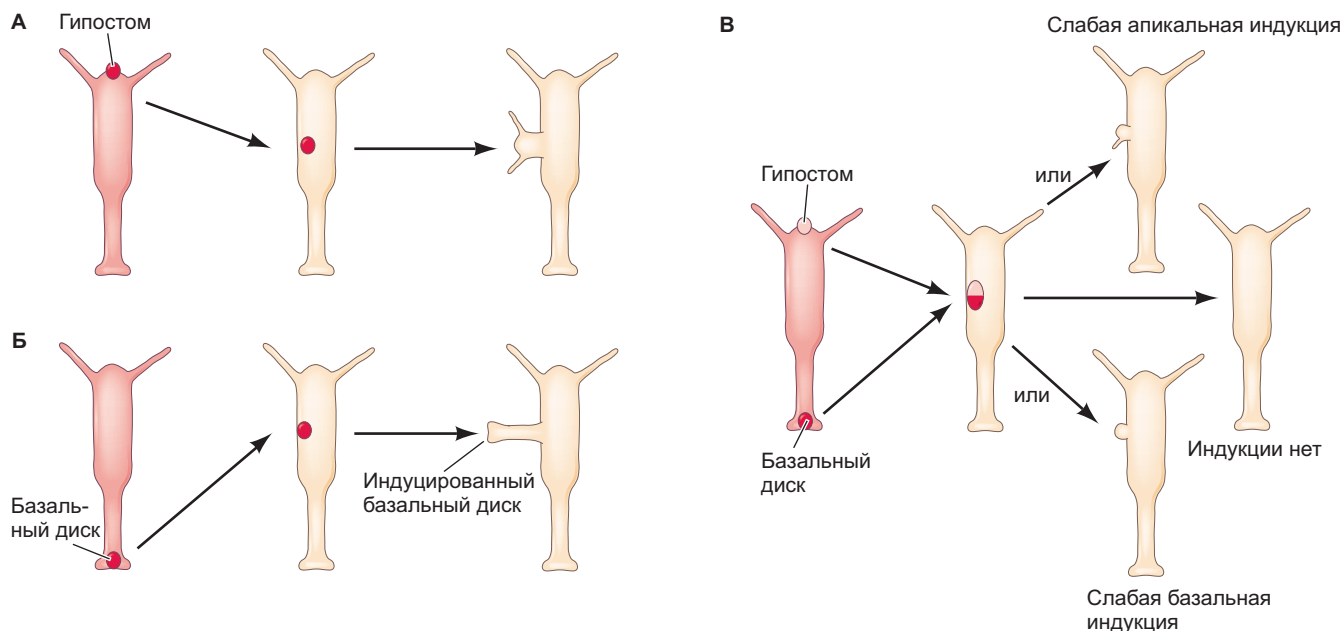
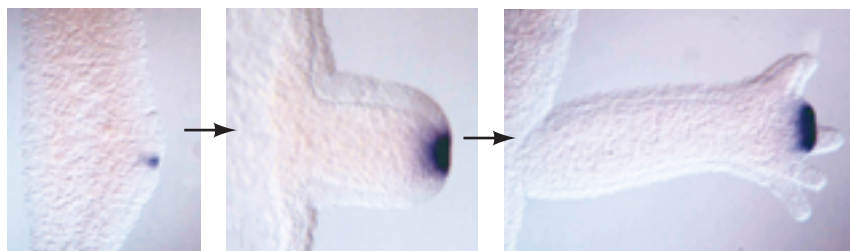


Рис. 22.15. Эксперименты с мечением, демонстрирующие различные морфогенетические возможности разных участков вдоль апикально-базальной оси гидры. **А.** Ткань гипостома, пересаженная на стебель принимающей особи, индуцирует вторичную ось с выраженным гипостомом. **Б.** Ткань базального диска, пересаженная на стебель принимающей особи, индуцирует вторичную ось с выраженным базальным диском. **В.** Если гипостом и ткань базального диска пересаживают вместе, индукция отсутствует или оказывается слабой. (По данным: S. A. Newman, 1974. *J Embryol Exp Morphol* 31: 541–555.)

Градиент WNT3 как индуктор. Главным индуктором головы, определяющим роль гипостома как организатора, является набор белков Wnt, действующих через канонический каскад β -катенина (Hobmayer et al., 2000; Broun et al., 2005; Lengfeld et al., 2009; Bode, 2009). Белки Wnt находятся на апикальном конце ранней почки, что определяет область гипостома по мере ее удлинения (**рис. 22.16А**). Если

ингибитор Wnt сигнального пути GSK3 в свою очередь оказывается ингибирован по всей оси тела, эктопические щупальца образуются на всех уровнях и каждый участок туловища приобретает способность стимулировать рост новых почек. Схожим образом трансгенная гидра с глобальным нарушением экспрессии β -катенина нижестоящего эффектора Wnt, формирует эктопические почки по всей длине

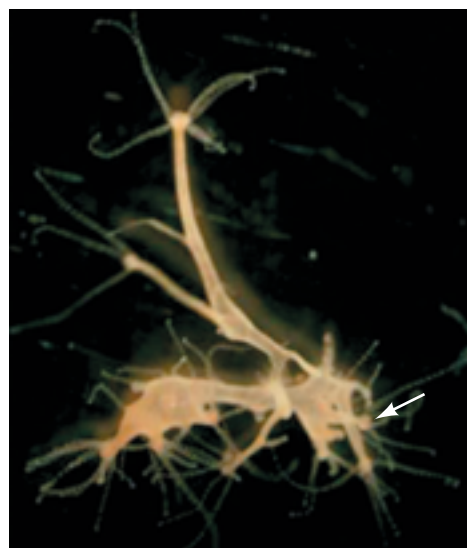
А Экспрессия мРНК Wnt3



Из: B. Hobmayer et al., 2000. *Nature* 407: 186–189, с разрешения T.W. Holstein и B. Hobmayer

Рис. 22.16. Сигнальный путь Wnt/ β -катенина в ходе почкования гидры. **А.** Экспрессия мРНК Wnt3 (фиолетовый) в гипостоме ранней почки (слева), почки на средней стадии (в центре) и почки с ранними щупальцами (справа). **Б.** Трансгенная гидра с нарушенной экспрессией β -катенина (обуславливающей действие Wnt) имеет множество почек в нетипичных местах (в том числе на других почках, как в случае, отмеченном стрелкой)

Б Нарушение экспрессии β -катенина



Из: L. Gee et al., 2010. *Dev Biol* 340: 116–124

тела и даже поверх новообразованных эктопических почек (рис. 22.16Б; Gee et al., 2010). При контакте с туловищем взрослой гидры гипостом индуцирует в нем Wnt-зависимую экспрессию гена *Brachyury* (так же как это делают организаторы у позвоночных), несмотря на отсутствие у гидры мезодермы (Broun et al., 1999; Broun and Bode, 2002). Эти результаты однозначно указывают на функцию белков Wnt (в частности Wnt3) как организаторов головы в ходе нормального развития гидры, но действуют ли они схожим образом при регенерации?

Регенерация за счет стволовых клеток у плоских червей

Плоские черви планарии способны к бесполому размножению делением надвое: они разделяются на переднюю и заднюю половины, каждая из которых регенерирует утраченные части. Во время регенерации каждый кусок воссоздает все клеточные типы, составляющие планарию, — фоторецепторы, нервные клетки, эпителий, мышцы, клетки кишечника и глотки, гонады (Roberts-Galbraith and Newmark, 2015). Лишь

? Загадки развития

Насколько полна градиентная модель регенерации планарий? Простейший надраз, делящий червя на переднюю и заднюю половины оказывается самым загадочным. В результате единственного разреза клетки спереди от него образуют хвост, а сзади — голову, т. е. непосредственные соседи до разреза дают начало абсолютно разным анатомическим структурам! Одной лишь локальной позиционной информации (которая у обоих наборов клеток будет практически идентичной) недостаточно для объяснения того, как регулируется смена клеточного развития, требуемая для регенерации.

недавно было показано, что за такую регенерацию отвечают те же плюрипотентные стволовые клетки, которые восстанавливают и замещают части тела. С начала XVIII в. было известно, что при разрезании планарии надвое, как это случается в ходе бесполого размножения, головная часть регенерирует хвост от места ампутации, а хвостовая регенерирует голову (рис. 22.17А, Б; Pallas, 1766). Однако лишь в 1905 г.

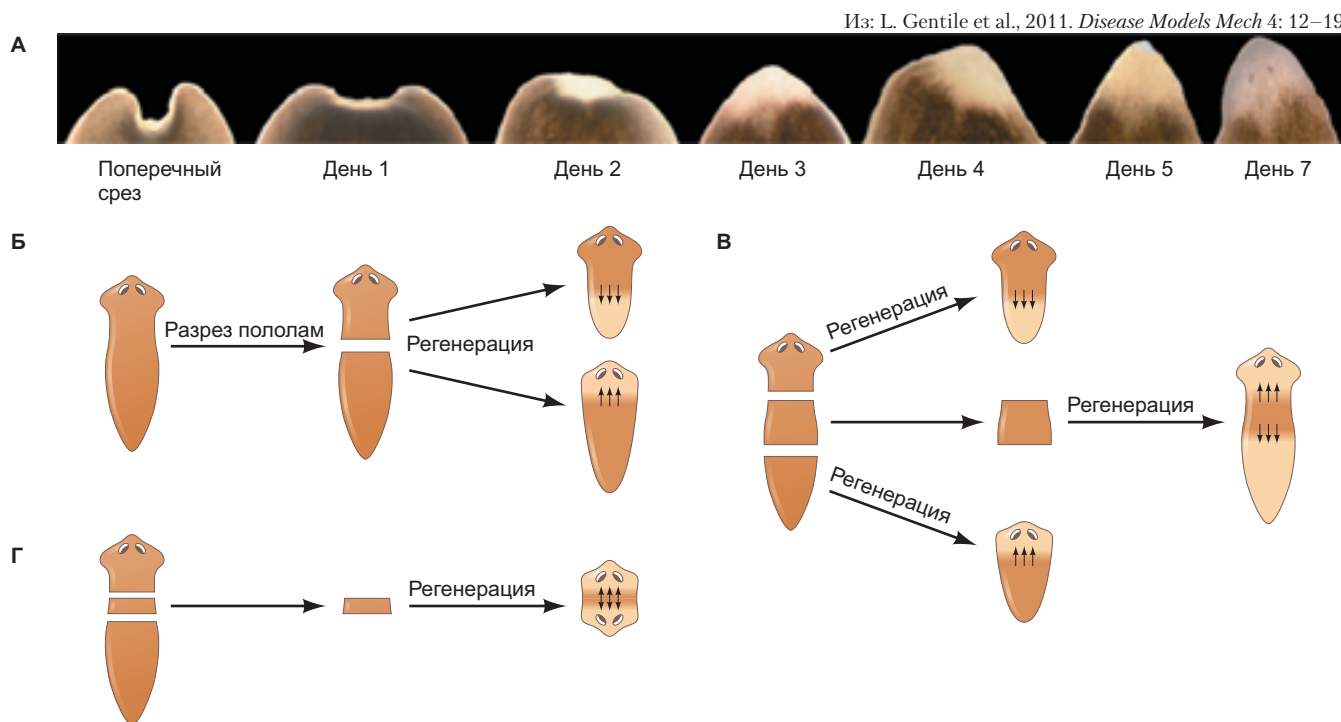


Рис. 22.17. Регенерация плоских червей и ее пределы. **А.** Последовательная съемка планарии, восстанавливающей новую голову после ампутации. **Б.** Если планарию разрезать пополам, передняя часть нижней половины регенерирует голову, в то время как задняя часть передней половины регенерирует хвост. Одна и та же ткань может произвести голову (если находится на переднем крае хвостовой части) или хвост (если находится на заднем крае головной). **В.** Если разрезать планарию на три части, средняя регенерирует голову на передней стороне и хвост на задней. **Г.** Если средняя часть слишком узкая, внутри не вмещается различимый градиент морфогенов и регенерация протекает аномально. (Рис. Б–Г по данным: R. J. Goss, 1969. *Principles of Regeneration*, pp. 56–73. Academic Press: New York.)

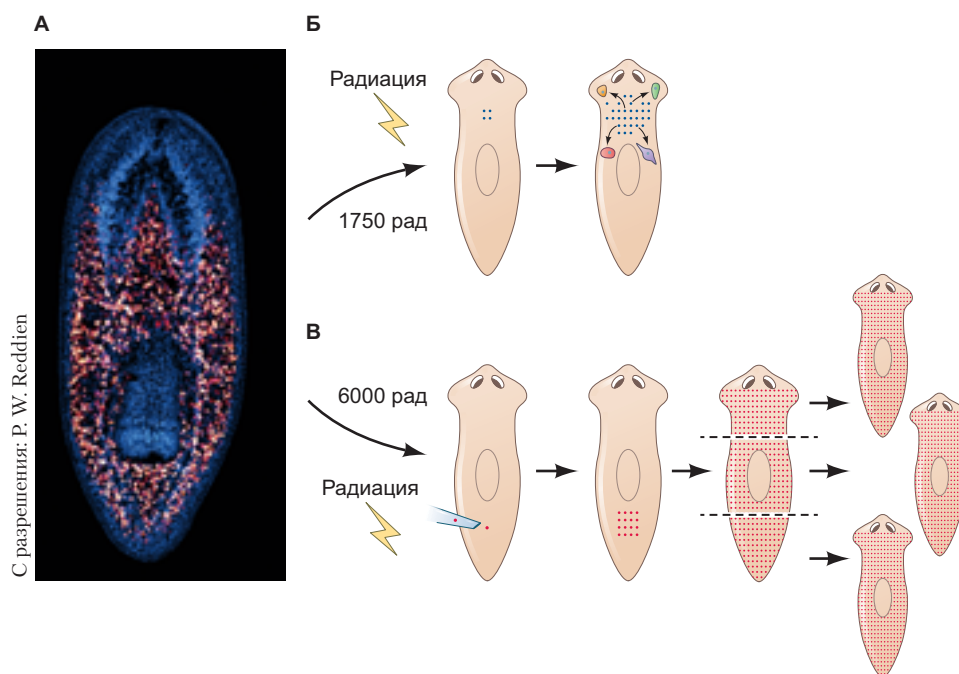


Рис. 22.18. Производство клеток во время регенерации планарий осуществляет популяция плюрипотентных стволовых клеток необластов. **А.** Необласты планарии *Schmidtea mediterranea*, меченные РНК-пробой к *soxP-2*. Каждый плюрипотентный необласт создает колонию необластов (показано красным; ядра окрашены синим) в теле червя. Эти клонотипные необласты производят дифференцирующиеся клетки в регенерирующей планарии. Необласты рассеяны по телу позади глаз, за исключением центрально расположенной глотки. **Б.** Облучение дозой 1750 рад убивает почти все необласты. Если хоть один клонотипный необласт выживает, он может поделиться и создать колонию делящихся клеток, которые в итоге произведут дифференцированные клетки органов. **В.** Облучение дозой 6000 рад устраняет все делящиеся клетки. Трансплантация единственного клонотипного необласта из донорской линии (красный) не только приводит к производству всех клеточных типов организма, но и восстанавливает способность организма к регенерации. (Рис. Б, В по данным: E. Tanaka and P. W. Reddien, 2011. *Dev Cell* 21: 172–185.)

Томас Хант Морган и Чарльз Мэннинг Чайлд осознали, что такая полярность указывает на важный принцип развития (Sunderland, 2010)¹. Морган указал на то, что, если отрезать у планарии и голову, и хвост, разделив ее на три части, средняя регенерирует голову на бывшей передней стороне и хвост на бывшей задней и никогда наоборот (рис. 22.17В). Далее, если средний сегмент будет достаточно тонким, регенерировавшие участки окажутся аномальными (рис. 22.17Г). И Морган (Morgan, 1905), и Чайлд (Child, 1905) постулировали существование антериопостериорного градиента материала, концентрированного в области головы. Градиент концентрации этого материала в средней части тела указывал бы

ей, что регенерировать на каждом из концов. В случае же слишком узкого куска определить градиент в его пределах было бы нельзя.

БЛАСТЕМА И ПОСТНАТАЛЬНЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Какие клетки образуют новые голову и хвост планарии? В течение десятилетий бытовало убеждение, что старые клетки у края разреза *дифференцируются* с формированием **регенерационной бластемы**, набора относительно недифференцированных клеток, которые будут организованы в новые структуры паракринными факторами на раневой поверхности (Baguña, 2012). Однако серия экспериментов Вагнера с коллегами, проведенных в 2011 г., обеспечила весомые доказательства в пользу того, что дедифференцировка *не* происходит. Вместо этого регенерационную бластему образуют плюрипотентные стволовые клетки, или **клонотипные необласты**, — группа плюрипотентных клеток планарий, служащих для замещения стареющих клеток взрослого организма (рис. 22.18А;

¹ До 1910 г. Морган, маэстро «мушиной лаборатории», был хорошо известен своими исследованиями регенерации планарий. Более того, лишь в 1900 г. он впервые упоминает *Drosophila* — в качестве корма для своих червей! Ему даже удалось «окрасить» кишечный тракт червей, скармливая им пигментированные глаза *Drosophila*. Позднее, заложив основу современной генетики, он отказался от планарий как модели наследственности в пользу *Drosophila* (Mittman and Fausto-Sterling, 1992).

Newmark and Sánchez Alvarado, 2000; Pellettieri and Sánchez, Alvarado 2007; Adler and Sánchez Alvarado, 2015; Zhu and Pearson, 2016; Reddien, 2018).

Клоногенные необласты могут мигрировать к месту ранения и регенерировать ткань. Вагнер с коллегами смогли показать, что после облучения планарий дозами, разрушающими практически все необласты (делящиеся клетки более уязвимы для радиации, чем неделящиеся, на чем и основана лучевая терапия опухолей), остаются отдельные животные с единственным выжившим клоногенным необластом. Из него образуются делящиеся клетки-предшественники, которые в итоге дают начало клеткам всех зародышевых листков. Такой ответ на базе единственной клетки показал, что необласты — плюрипотентные клетки взрослого организма, способные регенерировать все ткани планарии (рис. 22.18Б).

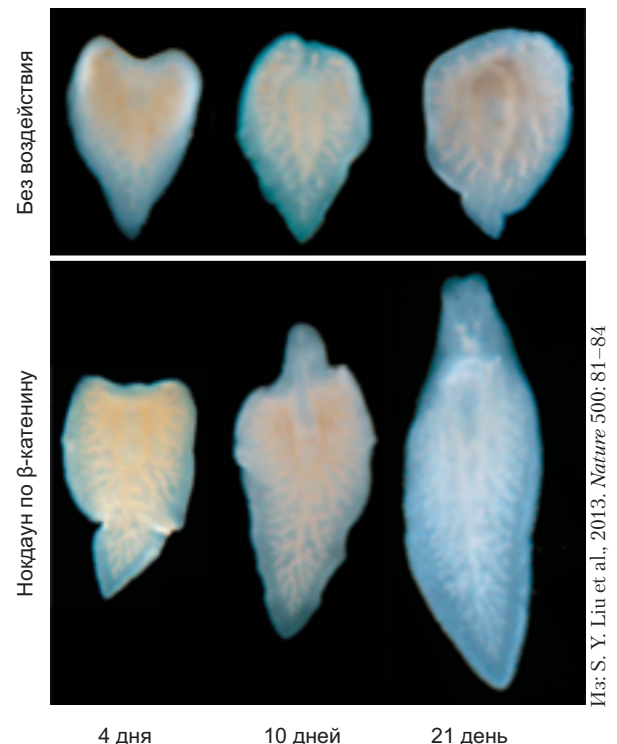
Если клоногенные необласты необходимы для регенерации, их полная утрата должна ей препятствовать. На следующем этапе исследователи облучили планарий так, что все делящиеся клетки были уничтожены (рис. 22.18В). Планарии погибли от нарушения возобновления тканей. Однако трансплантации единственного клоногенного необласта такому облученному плоскому червю в некоторых случаях хватало для восстановления всех клеток организма. Такие планарии не только выживали, но и делились, а все клетки потомков обладали генотипом того самого единственного донорского необласта. Эти результаты убедительно показали, что производство новых клеток в ходе регенерации планарий происходит из плюрипотентных стволовых клеток, сохраняющихся во взрослом организме (Wagner et al., 2011).

ПЕРЕДНЕ-ЗАДНЯЯ ПОЛЯРНОСТЬ

Как мы видели в случае с гидрой, сигнальный путь Wnt играет важную роль в установлении полярности и клеточного развития. У гидры положительная регуляция полярности происходит за счет сигнального пути Wnt/ β -катенина вдоль апикально-базальной оси. У планарий Wnt/ β -катенин нужен для установления передне-задней полярности в ходе регенерации; в этом случае, однако, активность Wnt через β -катенин способствует развитию хвоста, подавляя регенерацию головы (Gurley et al., 2008; Petersen and Reddien, 2008; 2011). В самом деле, в голове Wnt не экспрессируется, и предполагается наличие градиента функциональных белков от хвоста к голове. Таким образом, роли сигнального пути Wnt в формировании осей у гидры и планарии схожи тематически, но различаются эффектами.

В ряде лабораторий изучали контроль полярности в ходе регенерации головы планарии в сравнительном аспекте. Планарии видов *Procytola fluviatilis* и *Dendrocoelum lacteum* не способны регенерировать отрезанные головы. Исследователи восприняли эту

особенность как возможность идентифицировать важнейшие гены для обеспечения регенерационных способностей таких видов как *Dugesia japonica*. Сравнение транскриптомов клеток с переднего края бластемы у видов компетентных к регенерации и лишенных ее, показало, что у вторых повышена экспрессия генов, свидетельствующих о высокой активности сигнального пути Wnt/ β -катенина (Sikes and Newmark, 2013). Самое замечательное то, что ингибирование сигнального пути Wnt/ β -катенина у видов, лишенных регенерации, позволило им регенерировать полностью функциональные головы (рис. 22.19; Liu et al., 2013; Sikes and Newmark, 2013; Umeson et al., 2013). Эти результаты показывают ингибирующее действие сигнального пути Wnt/ β -катенина на спецификацию головы в ходе регенерации. У регенерирующих планарий β -катенин активируется (посредством Wnt) в задней бластеме, формирующей хвост. Как и в развитии позвоночных, формирование передних структур в регенерации планарий зависит от подавления сигнального пути Wnt, которое предотвращает аккумуляцию β -катенина и позволяет формировать голову. Если удалить β -катенин из задней (образующей хвост) бластемы путем РНК-интерференции, бластема образует го-



Из: S. Y. Liu et al., 2013. Nature 500: 81–84

Рис. 22.19. Восстановление регенерации головы *Dendrocoelum lacteum* после нокдауна β -катенина. Этот неспособный к регенерации плоский червь не отращивает голову после ампутации (верхний ряд). Если же ген β -катенина заблокирован путем РНК-интерференции (нижний ряд), этот вид приобретает способность регенерировать голову после ампутации в течение 21 дня

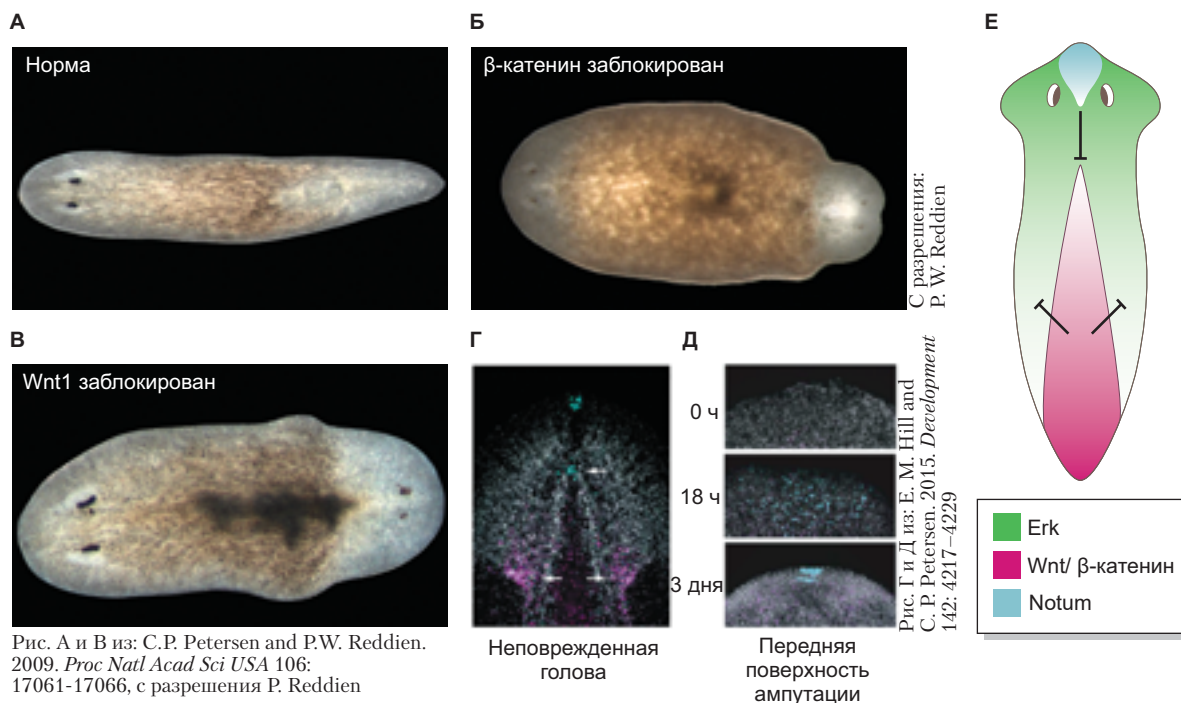


Рис. 22.20. Полярность в регенерации планарий. В норме Wnt производится в задней бластеме, а в результате получается хвост. **А.** Если заблокировать сигнальный путь Wnt РНК-интерференцией или против мРНК β -катенина (**Б**), или против мРНК Wnt1 (**В**), задняя бластема регенерирует голову, в результате чего вырастает червь с головами с обеих сторон. (**Г**, **Д**) Экспрессия *wnt11-6* (желтый) и *notum* (голубой) в голове планарии (**Г**) и в направленной вперед бластеме **Д**. *Chat* — генный маркер клеток нервной системы (**Г**, серый), все ядра маркированы красителем Hoechst (**Д**, серый). **Е.** Предложенная модель передне-задней полярности. Wnt ингибирует экспрессирующийся в передней части индуктор головы Erk, способствуя развитию хвоста, а экспрессию самого Wnt блокирует в наиболее передних частях головы белок Notum

лову (рис. 22.20). В самом деле, если с помощью РНК-интерференции полностью удалить β -катенин из нерегенерирующего червя, весь его организм становится головой, окаймленной глазами нормального размера (Gurley et al., 2008; Iglesias et al., 2008).

КАРТА МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ, УПРАВЛЯЮЩАЯ ГЕНАМИ КОНТРОЛЯ ПОЛОЖЕНИЯ

У организма, по-видимому, есть два пути восстановления утраченных частей: он может либо создать новые популяции клеток, которые достроят отсутствующие части с образованием полноразмерной особи, либо перераспределить существующие клеточные типы и уменьшить число клеток, занятых в каждой анатомической области, с образованием более мелкой регенерировавшей особи. Планарии, судя по всему, используют оба подхода. Как говорилось выше, у них образуется характерная бластема, поддерживающая создание новых клеток в месте ранения. Но они так же трансформируют существующие ткани, меняя клеточные типы для создания пропорционального, но маленького регенерата. Звучит невероятно, так как требует глобального перераспределения клеточ-

ных типов по всем осям. Как это может происходить? Существует ли какая-то морфологическая карта, дающая клеткам необходимую для такой перестройки позиционную информацию?

Эти вопросы будут волновать исследователей еще долгое время, но недавно полученные результаты указывают на то, что у планарии действительно есть карта презумптивных зачатков и она связана с экспрессией генов разметки эмбриона, определяющих развитие клетки и ее положение. Гены контроля положения (positional control genes), или ГКП (PCG), экспрессируются в течение всей жизни планарии (рис. 22.21А; Scimone et al., 2016; Reddien, 2018). Их экспрессия по всем осям связана с организацией мышечных волокон (рис. 22.21Б–Г; Witchley et al., 2013). Волокна идут в три слоя снаружи внутрь — кольцевые, диагональные и продольные (рис. 22.22А). Важно понимать, что утрата мышечных волокон разных слоев вызывает разные дефекты регенерации (рис. 22.22Б). Нокдаун *myoD* уменьшает число продольных волокон и отнимает способность к регенерации, в то время как потеря *nkx1-1* уменьшает количество кольцевых волокон и приводит к удвоению средней линии и головы после ампутации передней части (Scimone et al., 2017).

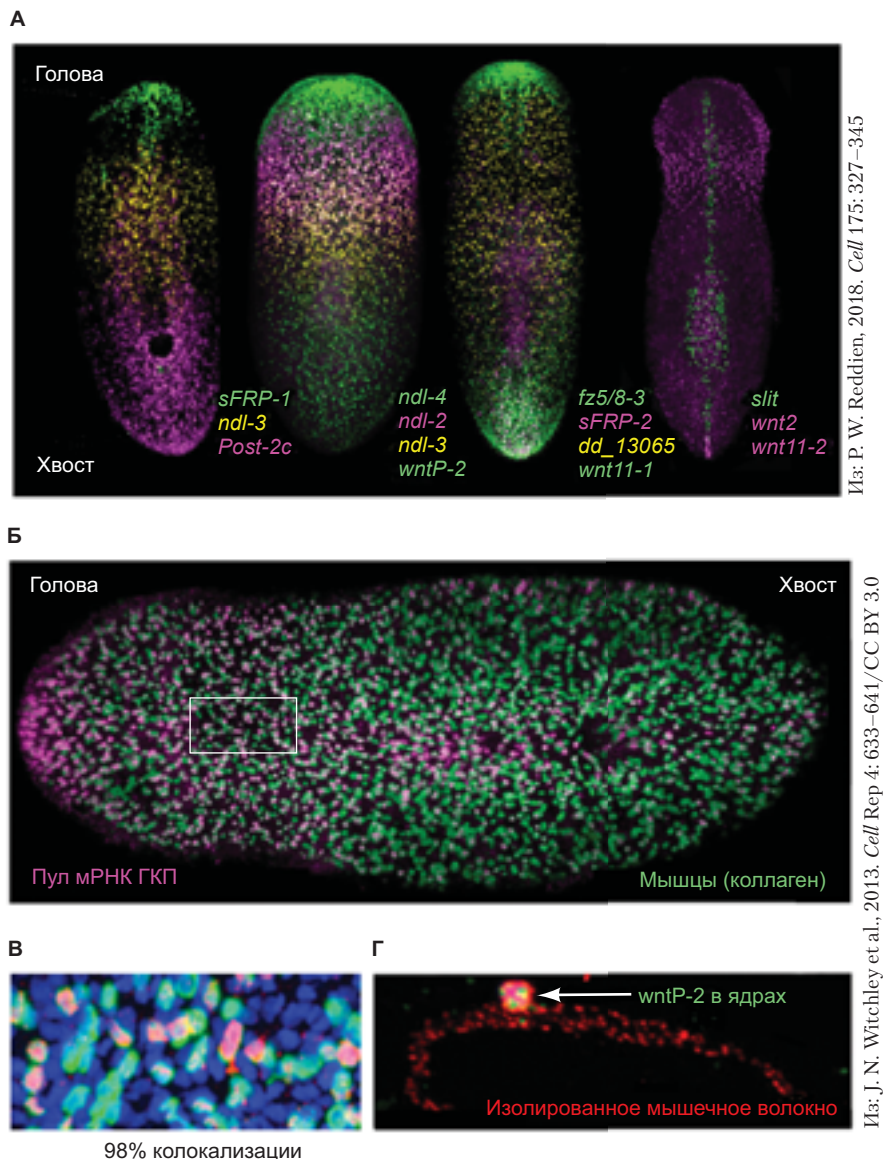


Рис. 22.21. Гены контроля положения (ГКП) у планарий. Флуоресцентная гибридизация *in situ* избранных ГКП по всем осям взрослой планарии (А). ГКП экспрессируются в первую очередь в дифференцированных мышцах. В некоторых участках тела планарии можно наблюдать идеальную колокализацию ГКП (малиновый) и мышц (зеленый) (Б, белая рамка; подробнее на рис. В). К примеру, можно видеть экспрессию *wntP-2* в удлиненном ядре изолированного мышечного волокна (Г)

МОДЕЛЬ: КАК ПОВРЕЖДЕНИЕ МЕНЯЕТ НАС

Если характер экспрессии ГКП в мышцах планарий представляет собой карту морфологической памяти, хранящей позиционную информацию, как эта карта помогает менять клеточное развитие в ходе регенерации утраченных частей? Мы уже знаем, что в установлении передне-задней оси ведущую роль играют противонаправленные градиенты, задействующие канонический сигнальный путь Wnt. Он способствует развитию хвоста у регенерата, подавляя образование головы, в то время как Notum, в норме экспрессирующийся в голове, подавляет экспрессию Wnt и открывает возможность регенерации головы (Birkholz et al., 2018; Reddien, 2018; Rink, 2018). Более того, два эти противопоставленных градиента вновь устанавливаются в передней бластеме на поверхности ампутации хвостовой части: Notum экспрессируется в самой передней области, а уровень экспрессии Wnt максимален сзади (рис. 22.20Д). Хотя фактически около 200 генов «неспецифично» индуцируются по-

вреждением, есть основание полагать, что индукция *notum* и *wnt1* в противоположных положениях — соответственно спереди и сзади — служит для реорганизации экспрессии ГКП благоприятным для регенерации образом (Wenemoser et al., 2012; Wurtzel et al., 2015). Более того, эта антагонистическая связь усиливается за счет саморегуляции сигнального пути Wnt/ β -катенина, служащей для координации его уровня экспрессии с близкой, но противодействующей системой разметки головы (вероятно, включающей Notum) (Stückemann et al., 2017). В целом модель состоит в том, что после повреждения индукция этих двух противонаправленных самоорганизующихся систем градиентов влияет на перераспределение клеточных типов вдоль передне-задней оси регенерирующего плоского червя. В свою очередь, происходит перезапуск экспрессии ГКП, что программирует развивающиеся под мышцами клоногенные необласты к образованию пропорционального червя меньших размеров (рис. 22.23).

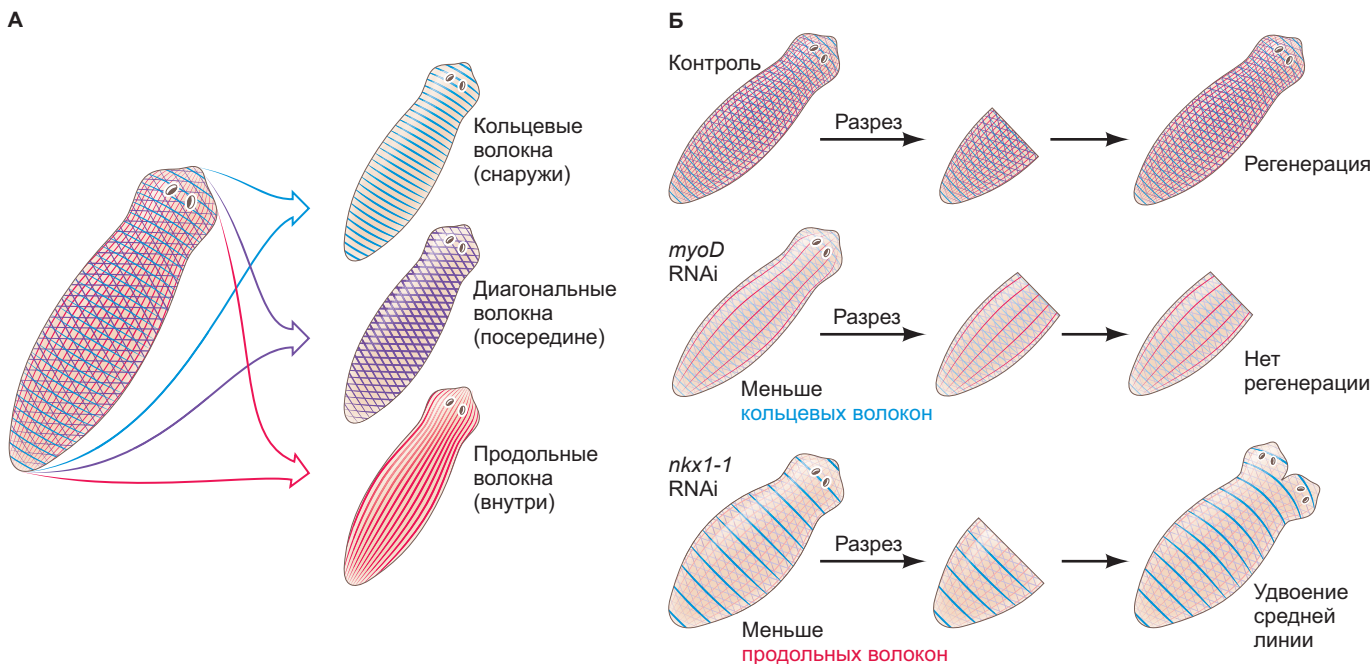


Рис. 22.22. Разные типы организации мышечных волокон по-разному влияют на регенерационную способность и организацию тела планарий. **А.** Три слоя мышечных волокон планарий. **Б.** Эффекты нокадаунов по *myoD* или *nkx1-1*, удаляющих соответственно продольные (в середине) или кольцевые (снизу) волокна. (По данным: S. Cutie et al., 2017. *Dev Cell* 43: 657–658 и M. L. Scimone et al., 2017. *Nature* 551: 623–628.)



Загадки развития

Что именно в нанесении раны вызывает индукцию *wnt* или *notum*? Что конкретно представляет собой раневой «сигнал»?

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

АЛЬТЕРНАТИВНАЯ КАРТА МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ: БИОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ

Учитывая роль ГКП и регуляторных генных сетей в контроле клеточной идентичности, не стоит забывать о возможности влияния физиологического состояния клеток на регенерацию. Различия в эндогенных электрических свойствах клеток на протяжении тела считают основой второй карты позиционной информации, известной как биоэлектрическая разметка (McLaughlin and Levin, 2018).

Термином «биоэлектрическая сигнализация» пользуются при описании коммуникации между клетками, основанной на изменениях разности мембранного потенциала (различий электрического заряда между сторонами мембраны), которая, как известно, может влиять на поведение клеток. Могут ли электрические свойства клеток влиять

и на регенерацию? Давайте рассмотрим, что происходит в ткани после повреждения. Клеточные контакты и даже сами мембраны могут быть сильно повреждены, что приводит к хаотичному движению ионов. Изменение содержания заряженных ионов снаружи и внутри клетки сразу меняет ее мембранный потенциал (напряжение мембраны, V_{mem}) (рис. 22.24А). Таким образом, в местах повреждения будет иметь место увеличение или уменьшение V_{mem} (соответственно гиперполяризация или деполяризация). К тому же, клетки с различными биоэлектрическими свойствами образуют видимые паттерны на протяжении целых тканей и организмов. Например, у планарии существует градиент V_{mem} от наиболее деполяризованных клеток головы к наиболее гиперполяризованным клеткам хвоста (рис. 22.24А). Фармакологические или молекулярные манипуляции с ионными каналами или щелевыми контактами с целью вызвать масштабную деполяризацию после ампутации головы и хвоста планарии приводят к тому, что участок из середины тела регенерирует две головы, направленные в разные стороны; если, напротив, вызвать масштабную гиперполяризацию, не образуется ни одной головы (рис. 22.24Б, В; Beane et al., 2011).

Как могут различия в мембранном потенциале влиять на перестройку целой ткани? Мы только

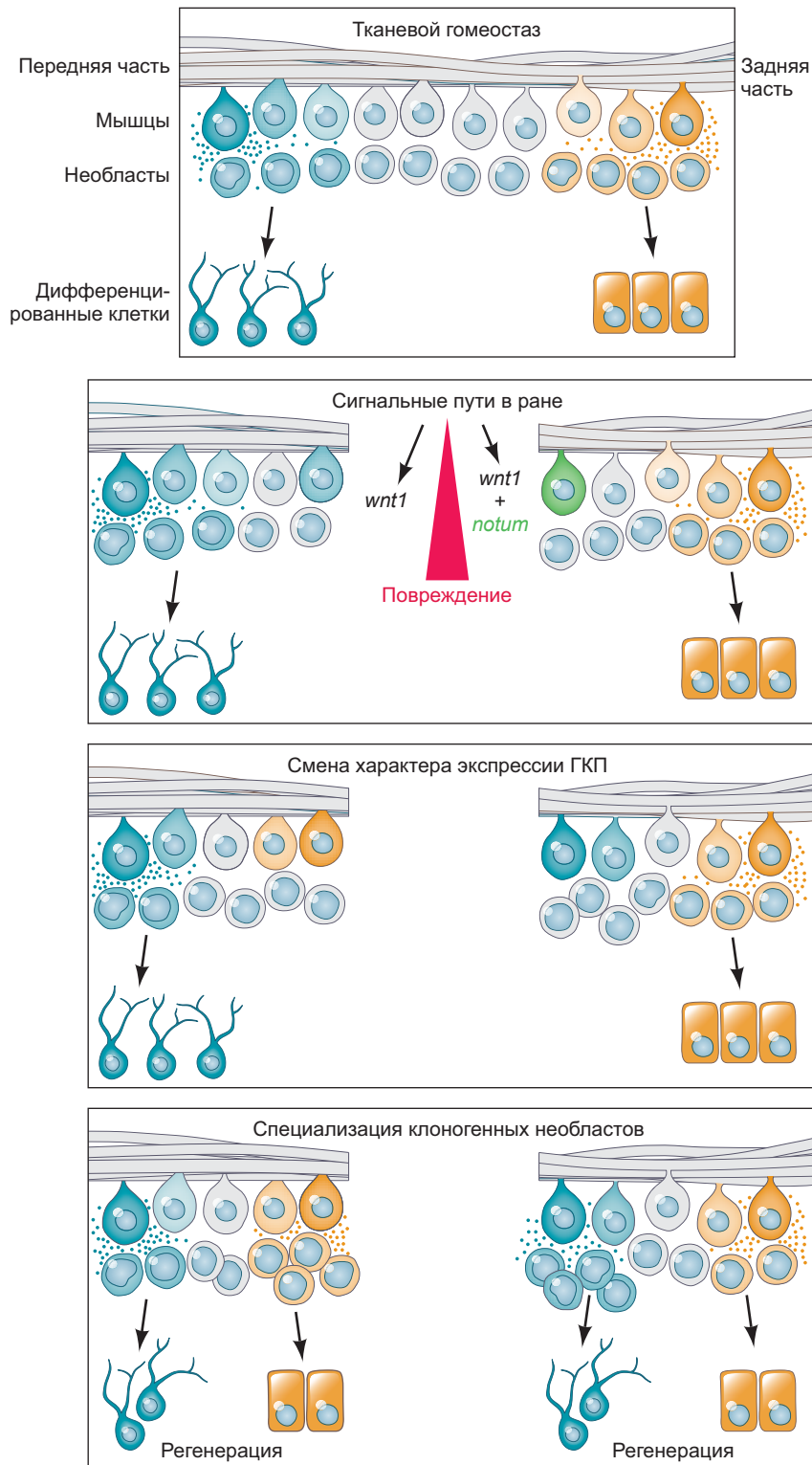


Рис. 22.23. Общая модель регенерации планарий. Сигнальные пути, индуцируемые ранением, приводят к перераспределению экспрессии *notum* и *wnt1* в передне-задней плоскости на поверхностях разреза. Новое распределение морфогенов поддерживает программы экспрессии ГКП, ведущие к специализации клоногенных необластов и последующей их дифференцировке. (По данным: P. W. Reddien, 2018. *Cell* 175: 327–345.)

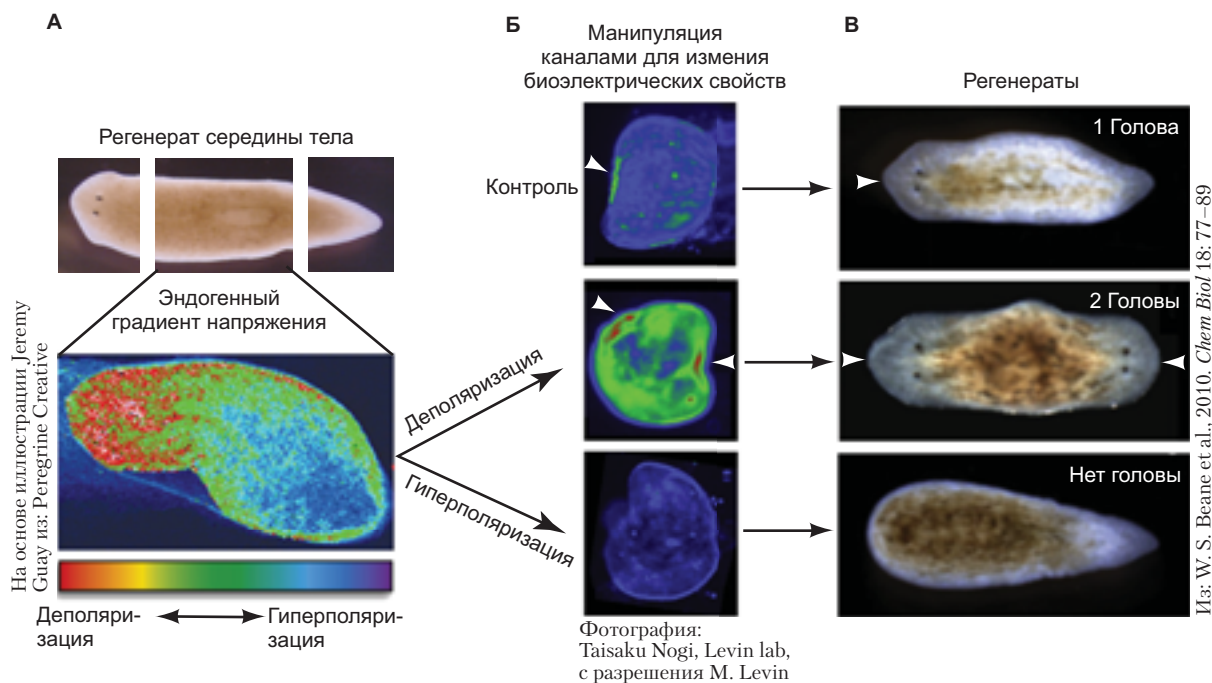


Рис. 22.24. Биоэлектрическая регуляция регенерации у планарий. **А.** Вырезанный из середины тела участок немедленно демонстрирует градиент разностей мембранных потенциалов вдоль передне-задней оси. **Б.** Фармакологическими или молекулярными манипуляциями с ионным транспортом можно добиться состояния деполаризации или гиперполяризации, визуализируемой прижизненным индикатором напряжения DiBAC. **В.** Деполаризация приводит к образованию эктопической головы на задней стороне, в то время как гиперполяризация блокирует развитие головы в целом

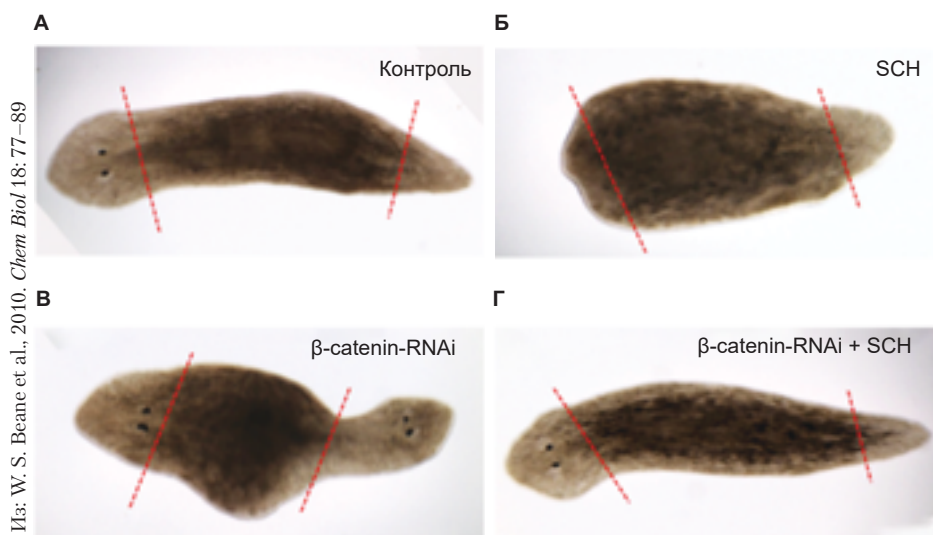


Рис. 22.25. Влияние биоэлектрических воздействий на сигнальный путь Wnt/β-катенина. Красные пунктирные линии указывают исходное положение разрезов, отделивших среднюю часть. Ткань снаружи линий — регенировавшая. **А.** Контроль. **Б.** Обработка SCH-28080 (SCH) — ингибитором протонной помпы (H^+/K^+ -АТФазы), которая устанавливает градиент напряжения у планарий, приводит к состоянию гиперполяризации и отсутствию формирования головы. **В.** Напротив, нокдаун по β-катенину вызывает удвоение головы. **Г.** Замечательно, что обработка SCH-28080 обращает этот эффект, предотвращая образование эктопической головы в ходе регенерации задней части



Рис. 22.26. Восстановление регенерационной способности у лягушки после метаморфоза путем модуляции биоэлектрических процессов. **А.** У контрольных лягушек регенерация конечности после ампутации не происходит. **Б.** Формирования blastемы и отрастания целой новой конечности можно добиться 24-часовым воздействием ионофоров (обработка «коктейлем»), меняющих биоэлектрическое состояние ампутированной конечности (*треугольники* указывают на остальные элементы, в том числе пальцы)

что узнали, как гены контроля положения затрагивают активацию и специализацию необластов и что ключевым игроком в контроле передне-задней полярности регенерации является сигнальный путь Wnt/ β -катенина. Чтобы две головы на среднем участке тела планарии не отрастали в результате утраты активности Wnt/ β -катенин, можно обработать участок гиперполяризующим агентом (**рис. 22.25**; Beane et al., 2011). Таким образом, биоэлектрические состояния могут работать через многие известные ГКП планарий. Этот факт указывает на динамичность морфогенетической карты и ее способность переводить физиологические эффекты в генетические программы, влияющие на форму (что-то вроде «физиологической эпигенетики») (Levin et al., 2017; 2018).

Дополнительные свидетельства в пользу механической роли биоэлектрических сигналов получены из сравнительных транскриптомных исследований эмбрионов *Xenopus*, регенератов аксолотля и дифференцирующихся человеческих мезенхимных клеток, подвергнутых деполяризации. В результате обнаружена консервативная транскрипционная сеть, ассоциированная с состоянием деполяризации (Pai et al., 2015). Замечательно, что изменение биоэлектрического состояния может даже восстановить регенерационную способность конечности лягушки после метаморфоза (**рис. 22.26**; Tseng and Levin, 2013). Более того, деполяризация человеческих клеток кости и жировых клеток частично репрограммирует их в мезенхимные стволовые клетки, часть которых снова становится способной к образованию и костной, и жировой ткани (Sundelacruz et al., 2013). Область биоэлектричества в развитии и регенерации еще развивается, но ее потенциальные приложения для регенеративной медицины обладают немалым потенциалом.

? Загадки развития

Забавный факт! Мы отмечали, что средний участок тела планарии, кратковременно подвергнутый деполяризации, регенерирует голову с обоих концов. Но мы не упомянули, что, если две головы вновь ампутировать, на этот раз в отсутствие любых модификаторов биоэлектрического состояния, средний участок тела, на удивление, все равно регенерирует две головы! Эти животные остаются двухговыми постоянно. Такую ампутацию можно проводить многократно, но результат будет одинаков. Учитывая, что деление надвое — нормальный путь размножения планарий, такую двухголовую морфологию можно считать наследуемым изменением целевой морфологии животного. Получается, что кратковременное изменение в биоэлектрическом состоянии ведет к долговременному переписыванию целевой морфологии. Как такой альтернативный эпигенетический механизм разметки тела может передаваться от поколения к поколению?

Тканеспецифичная регенерация у животных

Саламандра: эпиморфная регенерация конечности

После ампутации конечности взрослой саламандры оставшиеся клетки конечности создают новую, со всеми присущими ей дифференцированными клетками в правильном порядке. Замечательно, что регенерируют лишь отсутствующие части — не более и не менее. Например, при ампутации на уровне запястья у саламандры образуется новое запястье или стопа, но не локоть. Каким-то образом конечность саламандры «знает», в каком месте вдоль прокси-

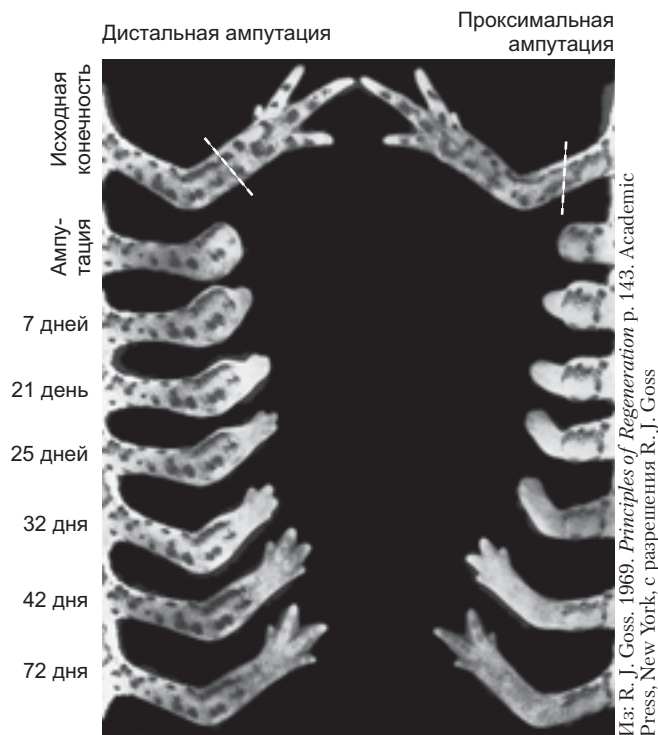


Рис. 22.27. Регенерация передней конечности саламандры: после ампутации ниже локтя (слева); после ампутации через плечевую кость (справа). В обоих случаях произошла сверка с актуальной позиционной информацией и в течение 72 дней регенерировала нормальная конечность

мально-дистальной оси произошло повреждение, и может регенерировать от этого уровня (рис. 22.27).

Регенерация конечности саламандры происходит благодаря образованию регенерационной бластемы на дистальном конце оперированной конечности (рис. 22.28). Как и у планарий, бластема является скоплением относительно недифференцированных клеток. Стадии регенерации конечности саламандры представлены ниже (рис. 22.29; Hass and Whited, 2017):

- 1) область ампутации заполняют иммунные и кровяные клетки, быстро образуется кровяной сгусток;
- 2) ранение запускает пролиферацию стволовых и прогениторных клеток;
- 3) эпидермальные клетки вдоль края среза мигрируют на поверхность раны с образованием **раневого эпидермиса**;
- 4) за счет пролиферации и продолжающейся миграции клеток раневой эпидермис утолщается, образуя **апикальную эктодермальную шапочку** (АЭШ);
- 5) сигналы от АЭШ к растущей под ней популяции прогениторных клеток способствуют развитию регенерационной бластемы;
- 6) продолжающаяся пролиферация и последующая дифференцировка бластемы поддерживают удлинение регенерата конечности.



Загадки развития

Как локальная рана запускает глобальную активацию пролиферации стволовых клеток по всему телу, в результате чего получается локализованная регенерационная бластема?

Определение клеток в регенерационной бластеме

ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКА И АКТИВАЦИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Исторически бластема конечности саламандры служила главным примером эпиморфной регенерации, при которой ткань в области раны дедифференцируется, а затем пролиферирует и редифференцируется в новые части конечности (Brookes and Kumar, 2002; Gardiner et al., 2002; Simon and Tanaka, 2013). Кости, дерма и хрящ непосредственно под областью ампутации вносят вклад в образование регенерационной бластемы, как и сателлитные клетки близлежащих мышц (Morrison et al., 2006). Недавние исследования с использованием аксолотля (мексиканской саламандры) выявили, что стволовые клетки по всему телу могут в ходе регенерации активироваться и по меньшей мере частично вносить свой вклад в формирование и поддержание бластемы (Payzin-Dogru and Whited, 2018). Любопытно, что подобная активация пролиферации стволовых клеток является системным ответом на локальное повреждение; повышенная пролиферация наблюдается также в контрлатеральной конечности, сердце, печени и спинном мозге (Johnson et al., 2018).

На сегодняшний день работа с регенерацией амфибий требует отказа от устоявшейся идеи о том, что есть некое принципиальное различие между опосредованным стволовыми клетками восстановлением у планарий и процессом дедифференцировки у саламандры. Эта идея в настоящее время претерпевает изменения в силу появляющегося понимания того, что сходств в этих двух системах на самом деле больше, чем различий (Nacu and Tanaka, 2011).

ОГРАНИЧЕНИЕ РАЗВИТИЯ

После ампутации конечности саламандры образуется кровяной сгусток. В течение 6–12 ч эпидермальные клетки культи мигрируют, покрывая поверхность раны раневым эпидермисом. В отличие от заживления ран у млекопитающих, шрам не образуется и дерма не мигрирует с эпидермисом в область ампутации. Короткие участки нервов конечности проксимальнее плоскости ампутации дегенерируют (Chernoff and Stocum, 1995).

В течение следующих четырех дней протеазы разрушают внеклеточный матрикс (ВКМ) тканей под раневым эпидермисом, высвобождая отдельные клетки, которые проходят впечатляющую дедифференцировку: костные и хрящевые клетки, фибробласты и миоциты теряют свои свойства. Снижается активность генов, экспрессирующихся в дифференцированных тканях (таких как *mrf4* и *myf5* мышечных клеток), в то время как экспрессия генов, ассоциирующихся с пролиферацией в зоне прогресса мезенхимы эмбриональной конечности (таких как *msx1*), возрастает (Simon et al., 1995). Дедифференцированные клетки

вместе с активированными стволовыми клетками мигрируют под раневой эпидермис и дают начало регенерационной бластеме под апикальной эктодермальной шапочкой. Именно эти клетки продолжают пролиферировать и в итоге редифференцируются с образованием новых структур конечности (Butler, 1935). АЭШ действует так же, как апикальный эктодермальный гребень (АЭГ) в нормальном развитии конечности (см. гл. 19; Han et al., 2001).

Один из остро стоящих вопросов регенерации: сохраняют ли клетки, вносящие вклад в бластему, память о своем происхождении? Другими словами,

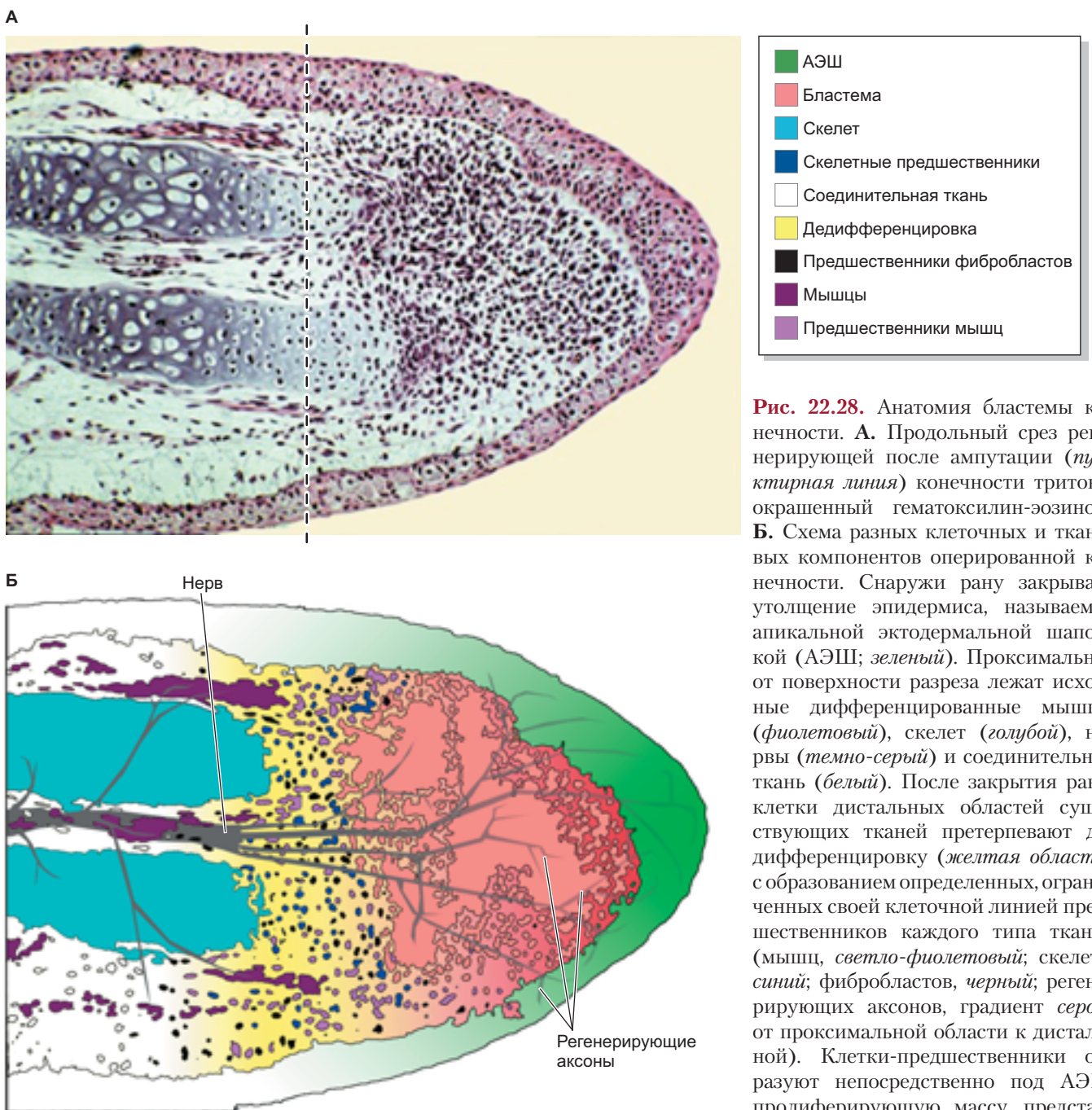


Рис. 22.28. Анатомия бластемы конечности. **А.** Продольный срез регенерирующей после ампутации (пунктирная линия) конечности тритона, окрашенный гематоксилин-эозином. **Б.** Схема разных клеточных и тканевых компонентов оперированной конечности. Снаружи рану закрывает утолщение эпидермиса, называемое апикальной эктодермальной шапочкой (АЭШ; зеленый). Проксимальнее от поверхности разреза лежат исходные дифференцированные мышцы (фиолетовый), скелет (голубой), нервы (темно-серый) и соединительная ткань (белый). После закрытия раны клетки дистальных областей существующих тканей претерпевают дедифференцировку (желтая область) с образованием определенных, ограниченных своей клеточной линией предшественников каждого типа тканей (мышц, светло-фиолетовый; скелета, синий; фибробластов, черный; регенерирующих аксонов, градиент серого от проксимальной области к дистальной). Клетки-предшественники образуют непосредственно под АЭШ пролиферирующую массу, представляющую собой бластему (красный)

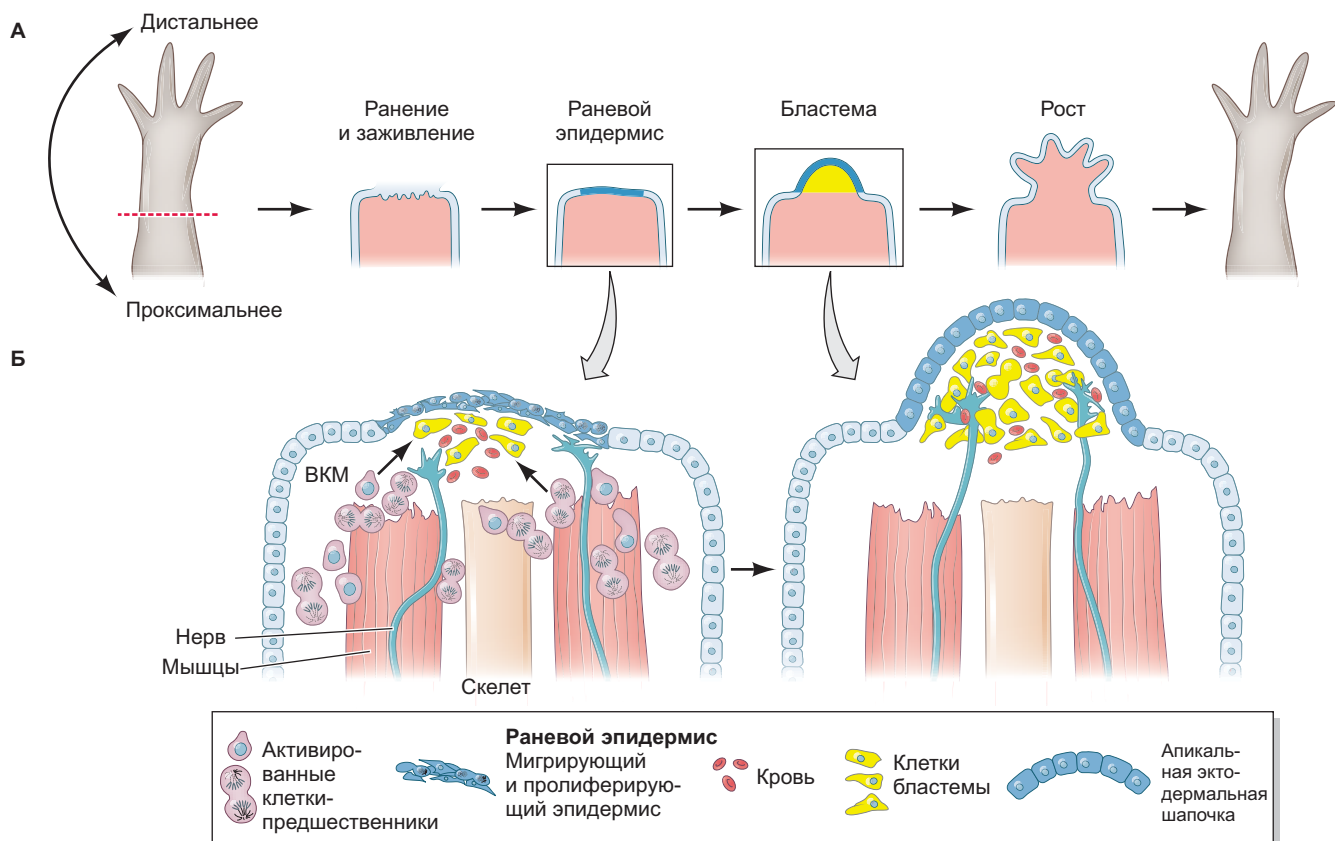


Рис. 22.29. Стадии регенерации конечности саламандры. (По данным: J. L. Whited and C. J. Tabin, 2009. *J Biol* 8: 5. doi:10.1186/jbiol105; B. J. Haas and J. L. Whited, 2017. *Trends Genet* 33: 553–565.)

новые мышцы возникают из дедифференцированных старых или же любая бластемная клетка может стать мышечной? Обнаружено, что бластема — не скопление гомогенных, полностью дедифференцированных клеток (Kragl et al., 2009). Скорее всего, в регенерирующей конечности аксолотля мышечные клетки происходят только из бывших мышечных, дермальные — из бывших дермальных, а хрящевые — только из бывших дермальных и хрящевых (**рис. 22.30**). Таким образом, бластема — не скопление неспецифицированных мультипотентных предшественников. Скорее, клетки сохраняют свою спецификацию, а бластема является гетерогенным набором линейно ограниченных клеток-предшественников.

ПОТРЕБНОСТЬ В НЕРВАХ И АПИКАЛЬНАЯ ЭКТОДЕРМАЛЬНАЯ ШАПОЧКА

Рост регенерационной бластемы зависит как от апикальной эктодермальной шапочки, так и от нервов. Если после ампутации препятствовать формированию АЭШ, немедленно стянув дорсальную и вентральную кожу на раневой поверхности и зашив края, регенерация полностью прекращается: бластема не образуется, не происходит рост. Интересно, что именно таким протоколом пользуются врачи в слу-

чае ампутации пальца или конечности. А вот если палец ребенка не закрывают таким образом, а оставляют открытым и поддерживают стерильность, он регенерирует. Следовательно, предоставить раневому эпидермису время для формирования АЭШ важно как для человека, так и для саламандры.

АЭШ стимулирует рост бластемы секретией Fgf8 (в точности как это делает апикальный эктодермальный гребень в нормальном развитии конечности), но это возможно только в присутствии нервов (Mullen et al., 1996). Бластему иннервируют и чувствительные, и двигательные аксоны: чувствительные напрямую контактируют с АЭШ, а двигательные оканчиваются в мезенхиме бластемы (см. **рис. 22.28В**). Было показано, что для протекания регенерации необходимо присутствие минимального количества нервных волокон какого-либо из типов (Todd, 1823; Singer, 1946, 1952, 1954; Singer and Craven, 1948; Sidman and Singer, 1960). Более того, нервные волокна необходимы для пролиферации и роста бластемы (**рис. 22.31**; Farkas et al., 2016; Farkas and Monaghan, 2017). Если конечность денервировать перед ампутацией, регенерации не будет. Если же поранить эпидермис целой проксимальной конечности и подвести туда нерв, сформируется эктопическая бластема, но не полноценный регенерат конечности. Эти два эксперимента указывают на то, что при-

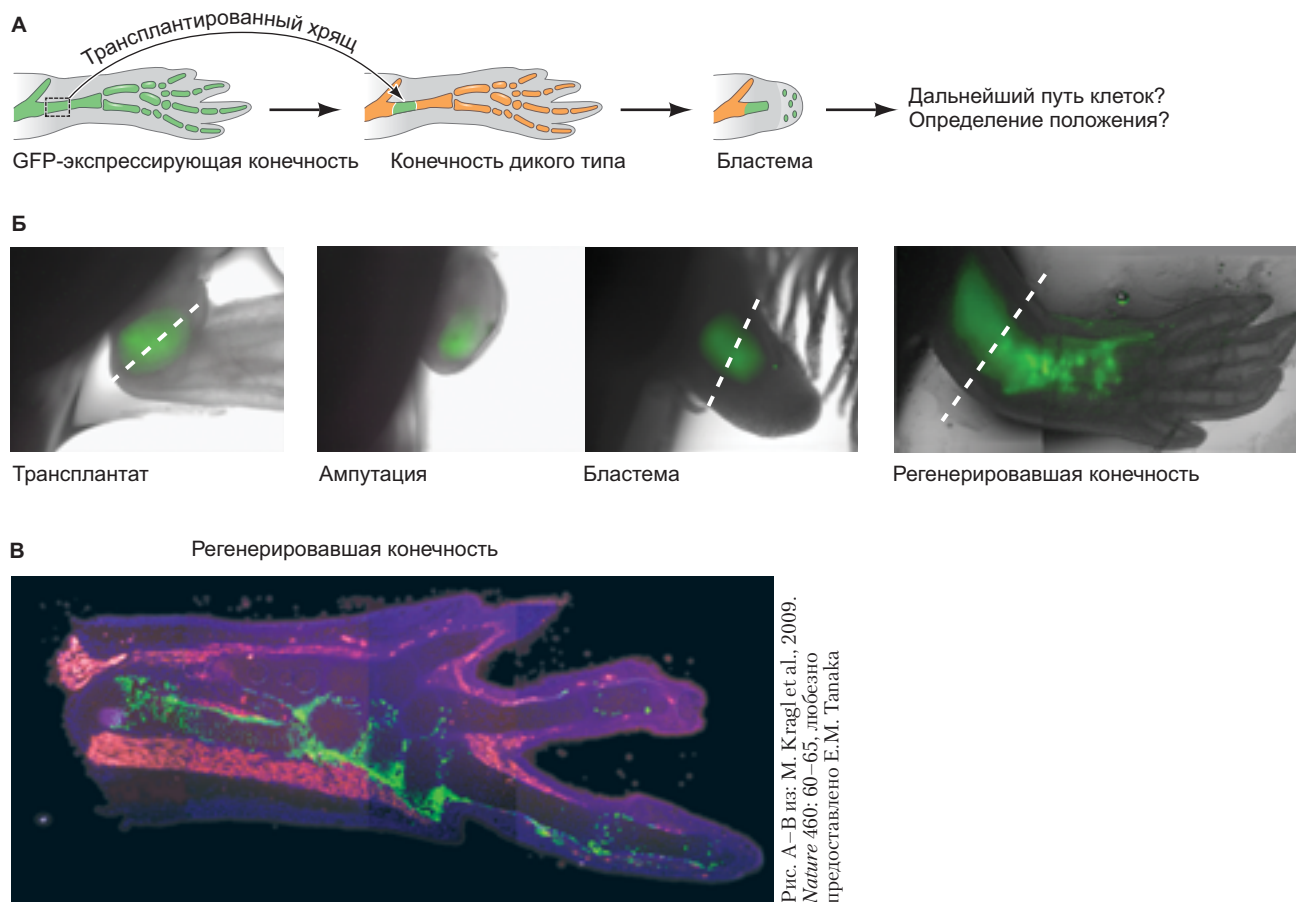


Рис. 22.30. Клетки бластемы сохраняют спецификацию, даже дедифференцируясь. (**А**, **Б**) Схематичное изображение процедуры по пересадке определенной ткани (в данном случае хряща) от саламандры, экспрессирующей трансген *GFP*, в конечность саламандры дикого типа. Позднее конечность ампутируют на уровне с экспрессией *GFP* и формируется бластема, содержащая *GFP*-меченые клетки, бывшие предшественники хряща. После этого регенерировавшую конечность изучают для выяснения, оказывается *GFP* только в регенерировавшем хряще или же в других тканях тоже. Пунктирные линии (**Б**) отмечают уровень ампутации. **В**. Продольный срез регенерата конечности через 30 дней после ампутации. Мышечные клетки окрашены красным; ядра окрашены синим. Большинство *GFP*-меченых клеток (зеленый) были обнаружены в регенерировавшем хряще; в мышцах их не было. (По данным: М. Kragl et al., 2009. *Nature* 460: 60–65)

сутствие нервов необходимо и достаточно для формирования бластемы¹. Для индукции полноценной эктопической конечности требуется не только подвести нерв к ране, но и подсадить вблизи раны кусок эпидермиса с противоположной стороны конечности (с заднего положения на переднее) (рис. 22.32А–Г; Endo et al., 2004). Эти результаты подтверждают, что в ходе нормальной регенерации конечности регене-

рирующие нервы доставляют к АЭШ важные сигналы. Кроме того, самих по себе сигналов от нервов недостаточно для роста эктопической конечности; для него нужны позиционные сигналы от эпидермиса, отличающиеся от исходящих из раны (Yin and Poss, 2008; McCusker and Gardiner, 2011, 2014). Что могут представлять собой благоприятствующие регенерации сигналы нервов и АЭШ?

Рыбка *Danio*: извлекая механизмы регенерации

До настоящего момента в этой главе мы обсуждали такие разнообразные механизмы регенерации, как морфаллаксис у гидры, вовлечение плюрипотентных стволовых клеток планарии и элегантный эпимор-

¹ Хотя эти эксперименты демонстрируют потребность в нервах, бластема вполне может быть приобретенной. Работа Сингера и коллег 1970 г. показала, что если нерв удалить из конечности в ходе развития и провести с таким животным эксперимент по анейрогенной конечности, регенерация произойдет. Конечности, в которой никогда не было нерва, он не нужен для регенерации. Это явление называют нейро-зависимостью, а механизмы его неизвестны.

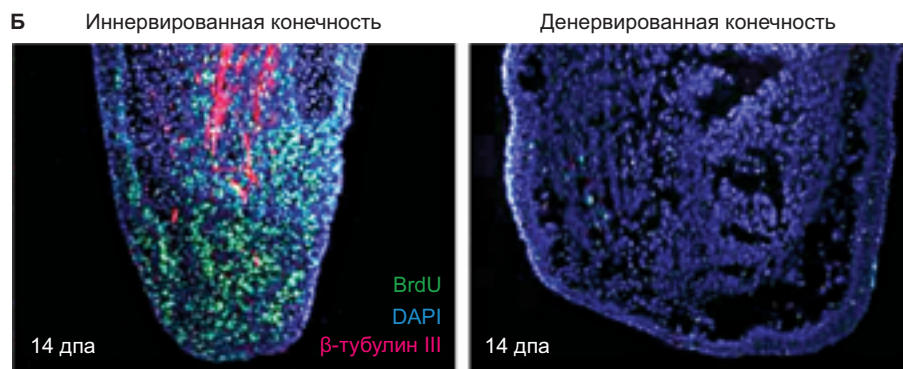
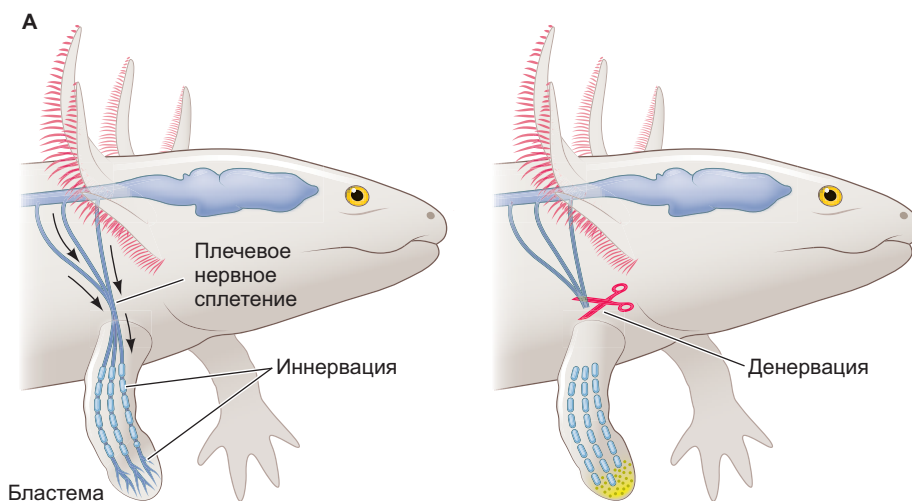
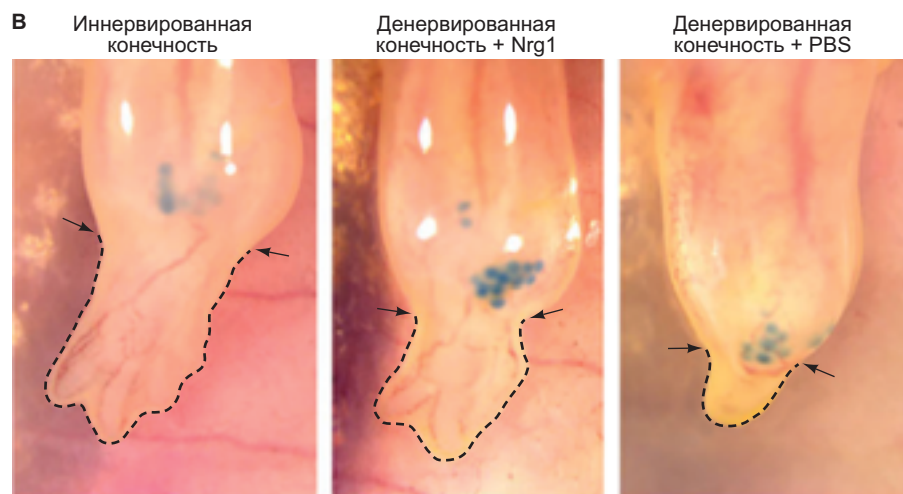


Рис. А и Б из: J. E. Farkas and J. R. Monaghan, 2017. *Neurogenesis (Austin)* 4: e1302216



Из: J. E. Farkas et al., 2016. *Development* 143: 2724–2731

Рис. 22.31. Необходимость иннервации и достаточность нейрегулина для регенерации конечности аксолотля. **А.** Схема эксперимента по денервации конечности. **Б.** Как видно на контрольном регенерате (слева), в норме бластема значительно иннервирована (на что указывает мечение нервов маркером β -тубулином III; красный) и густо заселена пролиферирующими клетками (BrdU; зеленый). Денервация (справа) практически полностью останавливает пролиферацию клеток (дпа — дней после ампутации). **В.** Имплантации бусин, покрытых нейрегулином-1 (Nrg1; синий), в денервированную конечность после ампутации достаточно, для того чтобы поддержать регенерацию до стадии образования пальцев, в отличие от бусин, смоченных в фосфатном буфере (PBS)

фоз, проявляющийся в бластеме саламандры. Далее мы более подробно углубимся в эти процессы, разбирая регенерацию органов у *Danio rerio*. Эту рыбку стали все чаще использовать в исследованиях регенерации органов благодаря ее регенерационным способностям, а также преимуществам в плане генетики и технических возможностей. Наиболее примечательна ее роль в исследованиях молекулярной регуляции регенерации плавника, сердца, центральной нервной системы, глаза, печени, поджелудочной железы, почек, кости и сенсорных волосковых клеток внутреннего уха и боковой линии (Shi et al., 2015; Zhong et al., 2016). Здесь мы отметим некоторые открытия, полученные в ходе изучения регенерации плавника и сердца *Danio*.

ПЛАВНИК ВО ВЛАСТИ WNT

Хвостовой плавник *Danio* расходуется вдоль дорсально-вентральной оси тела на 16–18 сегментированных костных лучах, разделенных межлучевой тканью. Регенерация плавников так просто запускается и так надежна, что их рутинно отрезают для молекулярного анализа в большинстве лабораторий, исследующих *Danio*. Луч плавника состоит в основном из кости, но содержит также разнообразный набор других кле-

точных типов, включая фибробласты, клетки кровеносных сосудов и нервов и пигментные клетки. Подобно конечности саламандры, после ампутации хвостового плавника раневую поверхность прежде всего закрывают эпидермальные клетки, образующие апикальную эпидермальную шапочку, а большинство типов тканей проходят дедифференцировку, пролиферацию и миграцию в дистальную область с образованием бластемы (Knopf et al., 2011; Stewart and Stankunas, 2012). Вклад в нее могут вносить и пока не идентифицированные резидентные стволовые или прогениторные клетки, способные создавать остеобласты в отсутствие других клеток кости (Singh et al., 2012).

Регенерат плавника можно разделить на четыре основных участка (рис. 22.33): 1) *дистальную бластему* из неделящихся фибробластов; 2) *пролиферирующую проксимальную бластему*, представляющую собой основную часть дедифференцированной мезенхимы; 3) *дифференцирующуюся проксимальную бластему*, поставляющую дифференцированные клетки к существующим и новообразованным тканям в ходе роста; 4) *латеральные эпидермальные слои*, служащие центром сигнальных комплексов в регенерации. Несмотря на кажущуюся простоту дистального роста, характеризующего регенерацию плавника, молекулярная регуляция этого процесса весьма сложна и вовлекает все основные сигналь-

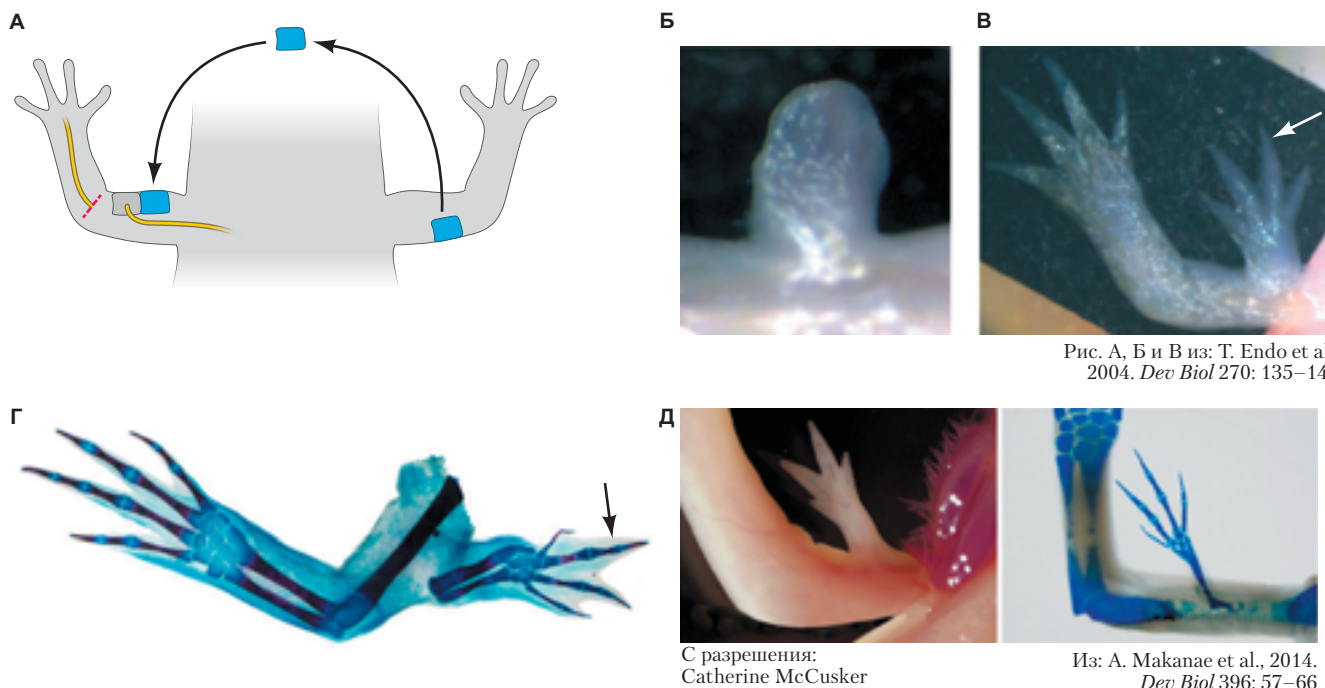


Рис. 22.32. Индукция эктопических конечностей у саламандры. **А.** Схема эксперимента по приведению нерва к ране (серый квадрат) и подсадке рядом с раной с задней стороны контрлатеральной конечности (синий квадрат). Результаты эксперимента показывают индукцию бластемы конечности (**Б**) и развитие полной конечности (**В**; стрелка). **Г.** Регенерировавшая дополнительная конечность (стрелка) правильно организована, что показано окрашиванием хрящевых экранов альциановым синим. **Д.** Образование дополнительных конечностей можно индуцировать одним лишь внедрением бусин, покрытых BMP2 (или BMP7) и Fgf2/8 в область раны на конечности

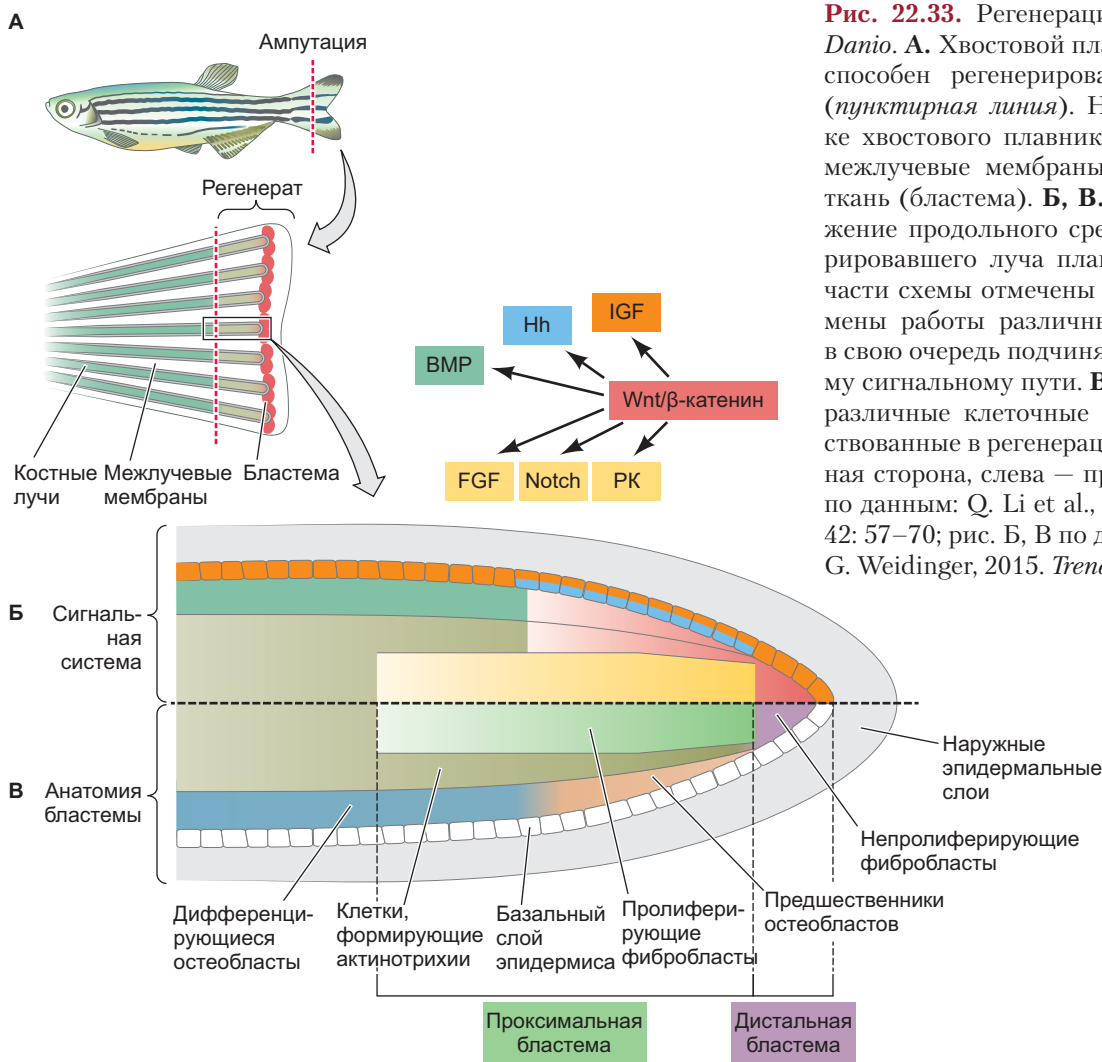


Рис. 22.33. Регенерация плавникового луча *Danio*. **А.** Хвостовой плавник взрослых рыбок способен регенерировать после ампутации (пунктирная линия). На увеличенном снимке хвостового плавника видны кости лучей, межлучевые мембраны и регенерировавшая ткань (бластема). **Б, В.** Схематичное изображение продольного среза отдельного регенерировавшего луча плавника. **Б.** На верхней части схемы отмечены пространственные домены работы различных сигнальных путей, в свою очередь подчиняющихся каноническому сигнальному пути. **В.** Внизу представлены различные клеточные компартменты, задействованные в регенерации. Справа — дистальная сторона, слева — проксимальная. (Рис. А по данным: Q. Li et al., 2014. *J Genet Genomics* 42: 57–70; рис. Б, В по данным: D. Wehner and G. Weidinger, 2015. *Trends Genet* 31: 336–343.)

ные пути, известные своей ролью в эмбриональном развитии. Здесь мы сосредоточимся лишь на одном из них — сигнальном пути Wnt/ β -катенина, который, как первая фишка домино, запускает проявление всего паттерна регенерации лучей плавника (Wehner and Weidinger, 2015). Сигнальный путь Wnt/ β -катенина активен в дистальной бластеме и наиболее латеральных частях проксимальной пролиферирующей бластемы, состоящих из предшественников остеобластов и актинотрихий (фиброзных элементов плавника; рис. 22.33). Экспериментальное угнетение и активация сигнального пути Wnt/ β -катенина приводят соответственно к понижению и повышению уровня пролиферации в бластеме и темпа регенерации (Kawakami et al., 2006; Stoick-Cooper et al., 2007; Huang et al., 2009; Wehner et al., 2014). Было показано, что неуместная экспрессия белка Axin1, ингибитора β -катенина, во всей бластеме плавника или только в латеральных прогениторных зонах приводит к существенному уменьшению лучей плавника и отсутствию их окостенения (рис. 22.34; Wehner et al., 2014). В то же время действие Wnt/ β -катенина, по-

видимому, опосредовано модуляцией других регуляторов деления, таких как белки Hedgehog (Sonic hedgehog и Indian hedgehog), Fgf8, ретиноевая кислота и инсулиноподобный фактор роста.

ЭПИМОРФОЗ, КОМПЕНСАЦИЯ И ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА

У *Danio* относительно простое трубчатое сердце. Венозная кровь приходит через венозный синус в единственное предсердие, перекачивается в единственный желудочек и покидает сердце через артериальный бульбус. Для изучения регенерации тканей сердца *Danio* было адаптировано несколько моделей повреждения, включая хирургическое удаление участков миокарда, криоповреждение и генетически индуцированное поражение конкретных тканей (Shi et al., 2015; Mokalled and Poss, 2018). Сердце *Danio* сохраняет способность регенерировать в течение всей жизни, отчасти благодаря поддержанию митотической активности кардиомиоцитов (мышечных клеток), составляющих большую часть его ткани (Poss

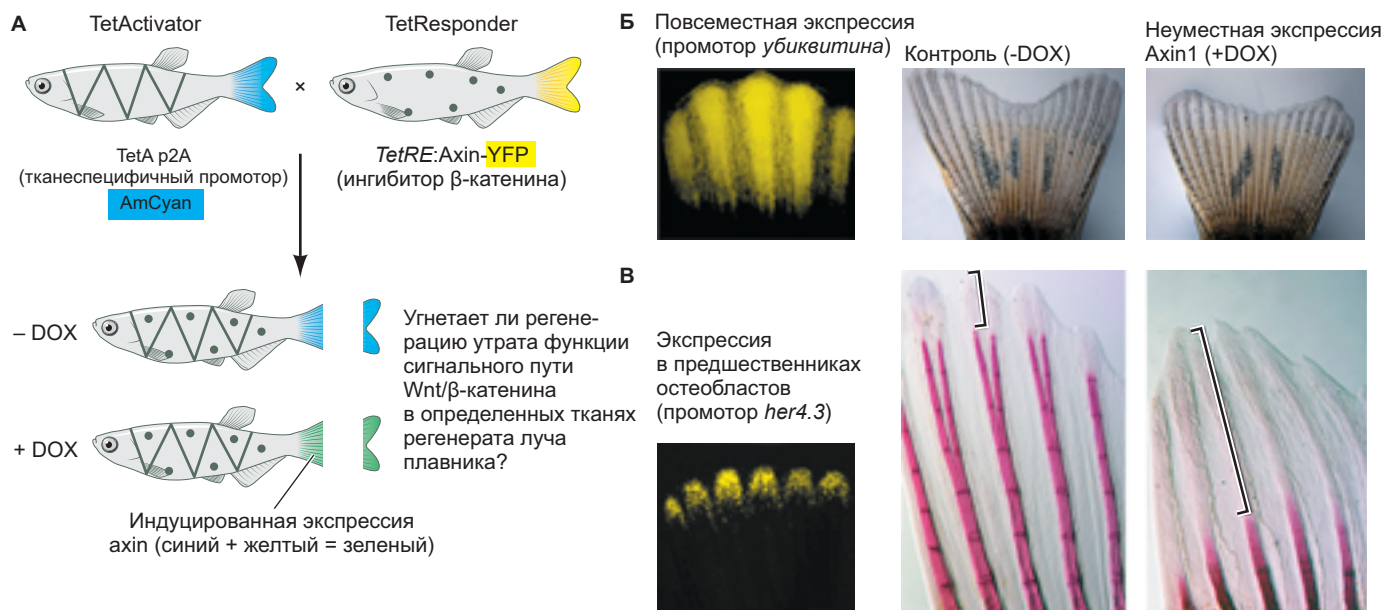


Рис. А, Б и В из: D. Wehner et al., 2014. *Cell Rep* 6: 467–481

Рис. 22.34. Проверка пространственно-временной зависимости от сигнального пути Wnt/β-катенина в ходе регенерации плавника. **А.** Схема эксперимента по индукции экспрессии генов с помощью системы Tet/On. У одной трансгенной рыбки экспрессия тетрациклина и голубой флуоресцентный белок внедрены под тканеспецифический промотор (*ubiquitin* или *her4.3*). У другой под промотор tet поставлена экспрессия Axin1-YFP; функциональная транскрипция этого трансгена происходит только в присутствии доксициклина (DOX). Скрещивание таких особей создает двойных трансгенов (изображенных точками и полосками) с управляемой в пространстве (за счет тканеспецифичного промотора) и времени (за счет DOX) экспрессией гена *Axin1*. **(Б, В)** Неуместная экспрессия Axin1 нарушает регенерацию. На фотографиях слева показан характер неуместной экспрессии Axin1 (желтый) под промоторами убиквитина (Б) или *her4.3* (В). На фотографиях справа показан хвостовой плавник через 12 дней после ампутации с искусственно вызванной (за счет DOX) экспрессией Axin1 и без нее. **Б.** Когда Wnt/β-катенин ингибируется неуместной экспрессией Axin1 по всему плавнику (под промотором убиквитина), темп регенерации плавника снижается. **В.** Когда Axin1 некорректно экспрессируется только в предшественниках остеобластов плавника (под промотором *her4.3*), серьезно нарушается окостенение лучей плавника в ходе регенерации (красный, скобки). (По данным: D. Wehner et al., 2014. *Cell Rep* 6: 467–481.)

et al., 2002). Ясно, что основной вклад в регенерацию взрослого сердца вносят существующие кардиомиоциты. Действительно, при использовании трансгенной системы Zebrafish (см. гл. 2) для отслеживания клеточных линий под контролем специфичных для сердца промоторов было показано, что дифференцированные кардиомиоциты дают начало клонами клеток регенерата (рис. 22.35; Gupta and Poss 2012). Эти и другие исследования (см. Развиваем тему) показывают, что в регенерации сердца *Danio* задействованы дедифференцировка, трансдифференцировка, образование бласты и компенсаторная пролиферация. Стадии регенерации сердца описаны ниже (рис. 22.36; González-Rosa et al., 2017):

1. Ранние ответы (рис. 22.36В):

а) повреждение, полученное в результате ампутации, замораживания или вызванное другими

средствами, приводит к воспалительному ответу, необходимому для дальнейшей регенерации *Danio*; макрофаги, нейтрофилы и другие клетки заселяют место повреждения;

б) у края полученного повреждения имеет место локальный апоптоз;

в) в норме плотно связанные клетки эндокарда «ошариваются» и начинают экспрессировать эмбриональные гены и гены цитокинов.

2. Каркас регенерации (рис. 22.36Г):

а) и эндокардиальные, и эпикардиальные клетки *Danio* пролиферируют и мигрируют на внутреннюю и наружную поверхности поврежденной ткани;

б) в области повреждения в конечном счете скапливаются миофибробласты и компоненты внеклеточного матрикса, создающие рубцовую фиброзную ткань.

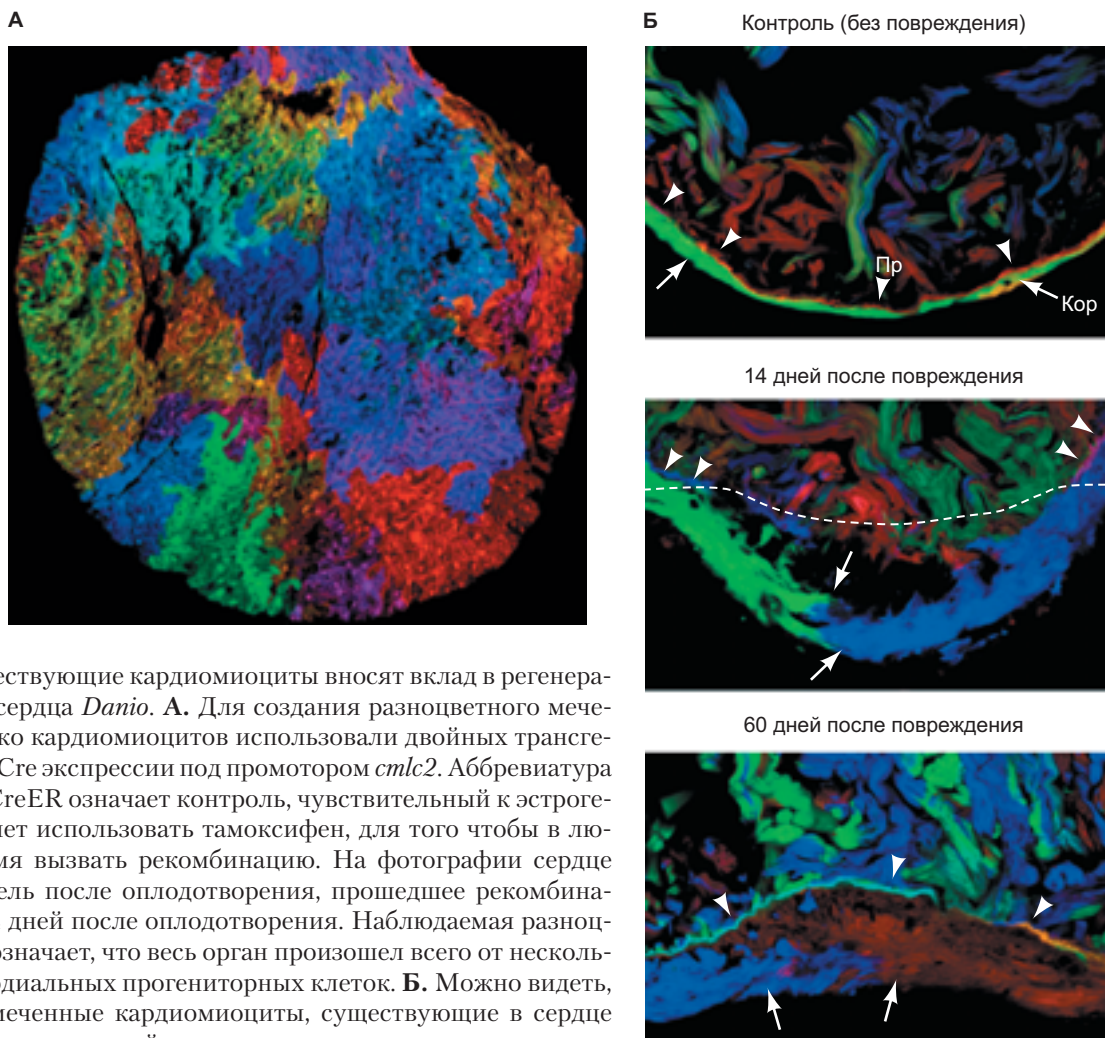


Рис. 22.35. Существующие кардиомиоциты вносят вклад в регенерацию желудочка сердца *Danio*. **А.** Для создания разноцветного мечения клонов только кардиомиоцитов использовали двойных трансгенов с контролем Cre экспрессии под промотором *cmhc2*. Аббревиатура «ER» в составе CreER означает контроль, чувствительный к эстрогенам, что позволяет использовать тамоксифен, для того чтобы в любое нужное время вызвать рекомбинацию. На фотографии сердце на стадии 6 недель после оплодотворения, прошедшее рекомбинацию в возрасте 4 дней после оплодотворения. Наблюдаемая разноцветная мозаика означает, что весь орган произошел всего от нескольких десятков кардиальных прогениторных клеток. **Б.** Можно видеть, как клонально меченные кардиомиоциты, существующие в сердце до операции, вносят основной вклад в регенерировавшую вентрикулярную ткань. Треугольники и стрелки показывают примордиальные (Пр) и кортикальные (Кор) слои соответственно

Рис. А и Б из: V. Gupta and K. D. Poss, 2012. *Nature* 484: 479–484

3. Сердечная бластема (рис. 22.36Д):

миокард (трабекулярный и кортикальный) на границе полученного повреждения претерпевает значительную пролиферацию.

4. Компенсаторная пролиферация и реваскуляризация (рис. 22.36Е):

а) стремительно формируются новые коронарные сосуды; реваскуляризация необходима для завершения регенерации;

б) пролиферация кардиомиоцитов усиливается во всем сердце;

в) возникшая фиброзная ткань постепенно утрачивается по мере регенерации.

5. Интеграция (рис. 22.36Ж):

а) фиброзный рубец окончательно удаляется и замещается миокардом, несколько более толстым, чем неповрежденный;

б) регенерировавший миокард становится в итоге функционально интегрированным в оставшееся сердце.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Компенсация отсутствующего

Во многих лабораториях было показано, что регенерация сердца взрослых *Danio* протекает в первую очередь путем дедифференцировки предсуществующих кардиомиоцитов (эпиморфоз), образования бластемы на месте ранения через локальную пролиферацию и миграцию и, наконец, редифференцировки клеток бластемы для восстановления сердца (Curado and Stainier, 2006; Lepilina et al., 2006; Kikuchi et al., 2010; Zhang et al., 2013). Было показано также, что здоровая ткань желудочка вдали от места острого повреждения тоже отвечает на него увеличением пролиферации (гиперплазия), что является компенсаторным механизмом регенерации (Poss et al., 2002; Sallin et al., 2015). Компенсаторную регенерацию часто сопровождает

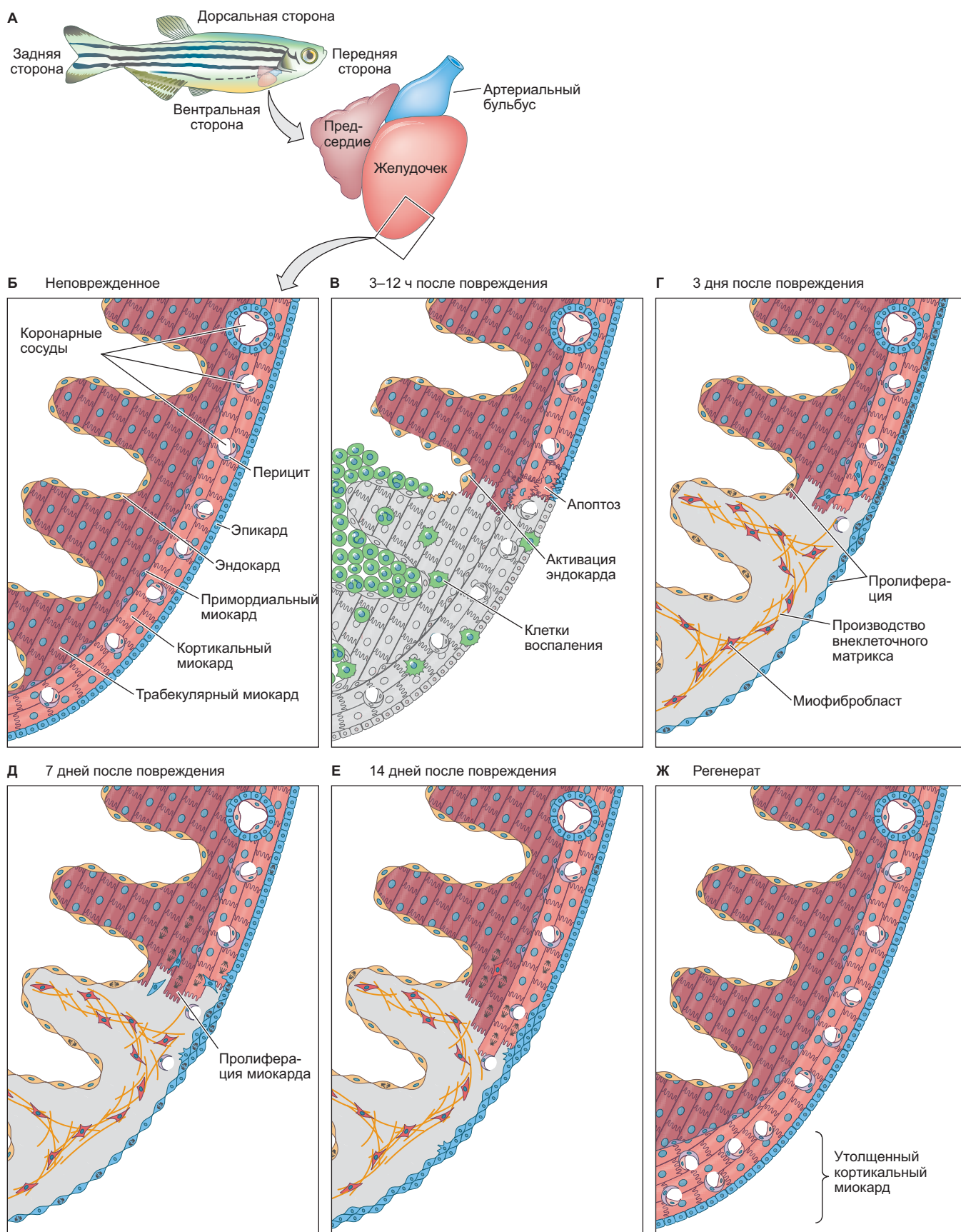


Рис. 22.36. А. Изображение взрослой особи *Danio* и частей ее сердца (вид сбоку). Б. Увеличенный вид поперечного среза участка стенки желудочка, выделенного на рис. А. (В–Ж) Стадии регенерации сердца *Danio*. (По данным: J. González-Rosa et al., 2017. *Regeneration* 4: 105–123/CC BY 4.0.)

гипертрофия (т. е. увеличение размеров клеток), но имеет ли она место в случае регенерации сердца *Danio*, еще только предстоит показать.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Изменения с заполнением пустот

Развивающееся сердце *Danio*, по-видимому, способно также к морфаллаксису или трансдифференцировке во время регенерации. Исследователи, работавшие с личинками *Danio*, индуцировали серьезные повреждения ткани желудочка, вызывая

апоптоз желудочковых кардиомиоцитов (Zhang et al., 2013). Это происходило путем целевой экспрессии нитроредуктазы (NTR) в желудочковых кардиомиоцитах под промотором тяжелой цепи миозина желудочка (*ventricular myosin heavy chain, vmhc*) и введения реагирующего с NTR цитотоксичного прекурсора. Такое вмешательство серьезно поразило ткань желудочка. Замечательно было происходившее после. Дифференцированные кардиомиоциты предсердия по соседству с местом повреждения отвечали на него миграцией в пораженную ткань желудочка и активацией специфичных для желудочка генов, например *vmhc* (рис. 22.37А). Через несколько месяцев

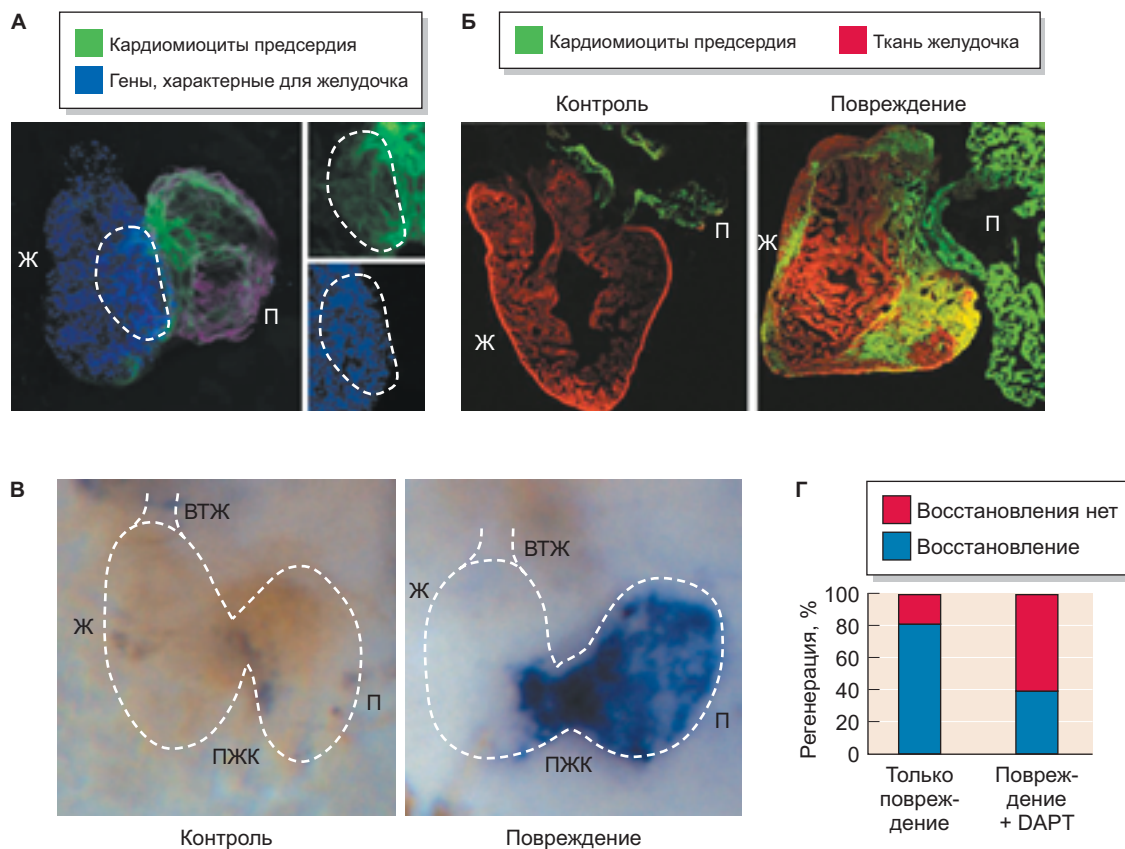


Рис. 22.37. Трансдифференцировка кардиомиоцитов предсердия в желудочковые в ходе регенерации сердца у личинки *Danio*. **А.** Мечение дифференцированных кардиомиоцитов предсердия (зеленый) показывает их миграцию из предсердия в поврежденную зону желудочка, после того как исследователи вызвали в ней апоптоз желудочковых кардиомиоцитов. В точке перехода во время миграции клетки предсердия начинают экспрессировать маркеры желудочка, что указывает на трансдифференцировку. **Б.** Через двенадцать месяцев после уничтожения ткани желудочка инфильтрующие его кардиомиоциты предсердия (зеленый) полностью дифференцируются в ткань желудочка (красный) и вносят вклад в функциональное сердце взрослой рыбы. **В.** Для успешного вклада кардиомиоцитов предсердия в регенерацию необходим сигнальный путь Notch-Delta. Через 12 ч после уничтожения желудочковых клеток (фото справа) deltaD и другие связанные гены (синее окрашивание) заметно активируются в кардиомиоцитах предсердия, особенно в мигрирующих к желудочку. **Г.** Фармакологическое ингибирование сигнального пути Notch с помощью DAPT во время уничтожения ткани желудочка серьезно нарушает регенерацию. П — предсердие; Ж — желудочек; ПЖК — предсердно-желудочковый канал; ВТЖ — выходной тракт желудочка. (Рис. Г по данным: R. Zhang et al., 2013. *Nature* 498: 497–501.)

отслеживание пути мигрировавших кардиомиоцитов предсердия показало, что они сохранились в стенке желудочка и внесли свой вклад в полностью регенерировавшее и функциональное сердце (рис. 22.37Б). Более того, сигнальный путь Notch-Delta значительно активируется в миокарде предсердия и необходим для восстановления поврежденного желудочка за счет предсердия (рис. 22.37В). Фармакологическое ингибирование сигнального пути Notch с помощью DAPT во время уничтожения ткани желудочка серьезно нарушает регенерацию сердца (рис. 22.37Г; Zhang et al., 2013). Эти результаты указывают на то, что как минимум в ходе развития личинки кардиомиоциты способны претерпевать трансдифференцировку для поддержания регенерации сердца. Таким образом, по-видимому, сердце рыбы задействует множество механизмов для обеспечения регенерации: формирование бластемы путем эпиморфоза, компенсаторную пролиферацию и Notch-опосредованную трансдифференцировку.

Регенерация у млекопитающих

Хотя млекопитающие не могут похвастать тем же уровнем регенерационных способностей, что у других позвоночных, они способны регенерировать отдельные структуры. Ниже мы обсудим некоторые примеры регенерации у млекопитающих: хорошо известную компенсаторную регенерацию печени, случаи регенерации кончиков пальцев в юном возрасте, удивительный пример регенерации сердца у новорожденных мышей и превосходную способность к регенерации кожи у иглистых мышей.

Компенсаторная регенерация печени млекопитающих

В греческой мифологии в наказание за дар огня, принесенный людям, Прометей был прикован к скале, где его печень ежедневно выклевывал орел. Ночью печень вырастала, обеспечивая орла пищей, а Прометея — вечным страданием. Сегодня регенерацию печени запускают стандартной процедурой частичной гепатэктомии, т. е. удалением конкретных долей печени (в отличие от истории Прометея, под анестезией), в то время как другие остаются нетронутыми. Хотя удаленные доли уже не отрастают обратно, оставшиеся увеличиваются, компенсируя утраченную ткань (Higgins and Anderson, 1931). Количество регенерировавшей ткани эквивалентно количеству удаленной. Подобная **компенсаторная регенерация** — деление дифференцированных клеток для восстановления структуры и функции поврежденного органа — была, как описано выше,

обнаружена в сердце *Danio* и присуща печени млекопитающих.

Человеческая печень регенерирует путем пролиферации существующей ткани. Удивительным образом клетки регенерирующей печени не дедифференцируются полностью, входя в клеточный цикл. Регенерационная бластема не формируется. Скорее регенерация печени млекопитающих обладает двумя линиями защиты, первая из которых состоит из нормальных зрелых гепатоцитов взрослой печени. Эти зрелые клетки обычно не делятся и получают инструкцию к вхождению в клеточный цикл и пролиферации до того момента, как утраченная часть оказывается компенсирована. Вторая линия защиты, о которой пойдет речь ниже, — популяция прогениторных клеток печени. Они обычно покоятся, но активируются, если повреждение значительно и зрелые гепатоциты не могут хорошо регенерировать из-за старения, злоупотребления алкоголем или болезни.

В нормальной регенерации все пять типов клеток печени — гепатоциты, клетки желчных протоков, жирозапасующие клетки (клетки Ито), эндотелиальные клетки, Купферовские макрофаги — начинают делиться, производя больше себе подобных. Каждый клеточный тип сохраняет свою идентичность, а печень — способность к синтезу специфичных ферментов, необходимых для регуляции уровня глюкозы, деградации токсинов, синтезу желчи, производству альбумина и других своих функций даже во время регенерации (Michalopoulos and DeFrances, 1997).

Скорее всего, существует несколько избыточных путей, которые инициируют пролиферацию клеток печени и регенерацию (рис. 22.38; Riehle et al., 2011). Глобальный анализ экспрессии генов показывает, что конечным результатом их работы оказывается угнетение (но не полное прекращение) работы генов, вовлеченных в работу дифференцированных клеток печени, с активацией генов, готовящих клетку к митозу (White et al., 2005). Удаление или повреждение печени проявляется через кровеносную систему: оно отражается в утрате одних факторов, специфичных для печени, и повышении уровня других (например, желчных кислот или липополисахаридов кишечника). Липополисахариды побуждают некоторые клетки других типов к выделению паракринных факторов, позволяющих оставшимся гепатоцитам вновь входить в клеточный цикл. Купферовские клетки выделяют интерлейкин 6 (IL6) и фактор некроза опухоли α (обычно вовлеченные в активацию иммунной системы взрослого организма), а звездчатые клетки выделяют паракринные **фактор роста гепатоцитов** (hepatocyte growth factor, HGF) и TGF β . Специализированные кровеносные сосуды печени производят HGF, так же как Wnt2 (Ding et al., 2010). Травма при частичной гепатэктомии может активировать металлопротеиназы, которые лизируют внеклеточный матрикс, позволяя гепатоцитам отделяться и пролиферировать. Эти ферменты могут также расщеплять

Рис. 22.38. Корреляция изменений экспрессии генов с увеличением массы печени после гепатозектомии. **А.** Изначальные пики в синтезе ДНК видны и в гепатоцитах (Г ДНК; *зеленый*) и далее в непаренхимных клетках (НП ДНК; *желтый*). Всплеск в синтезе ДНК соотносится с активацией экспрессии генов, зависящих от роста (**Б**) и прохождения клеточного цикла (**В**), которые сходят на нет по мере восстановления нормальных значений массы печени (*коричневый* на рис. А). **Г.** В целом экспрессия генов остается на высоком уровне после фазы роста, что отражает функциональность регенировавшей ткани печени. (По данным: R. Taub, 2004. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 836–847, R. Taub, 2003. В: *Hepatology: A Textbook of Liver Disease*, 4th ed., D. Z. Zakim & W. B. Boyer [Eds.], Saunders: Philadelphia.)

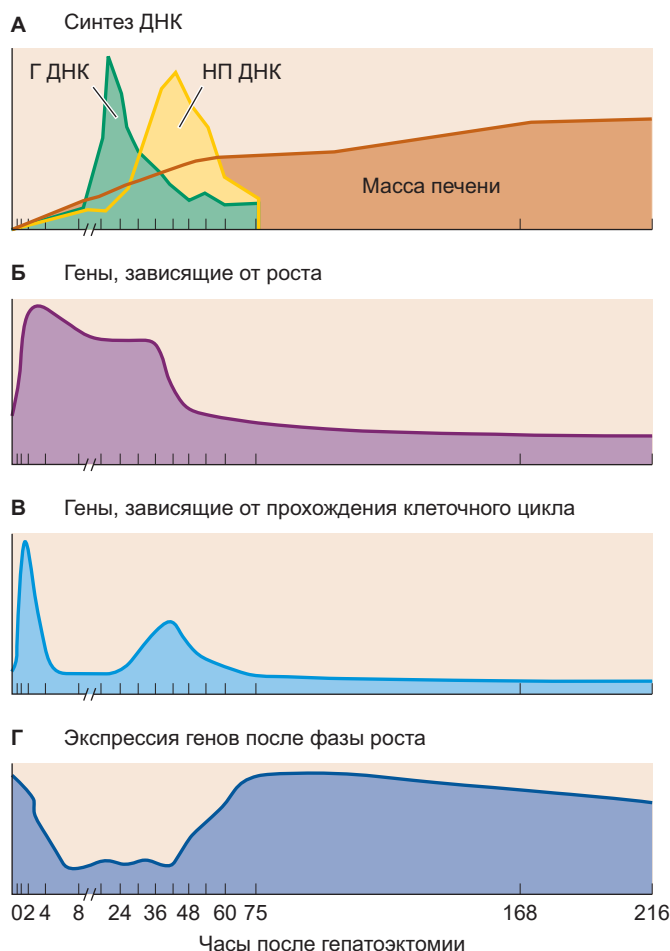
HGF до его активной формы (Mars et al., 1995). Совместное действие факторов, производимых эндотелиальными клетками, Купферовскими клетками и звездчатыми клетками, позволяет гепатоцитам делиться, предотвращая апоптоз, активируя циклины D и E, подавляя такие ингибиторы циклинов, как p27 (Taub, 2004).

Печень перестает расти по достижении исходного размера; механизм, стоящий за этим, пока не известен. Одну из подсказок, впрочем, дают эксперименты по парабриозу, в которых хирургически объединяют кровеносные системы двух крыс. Частичная гепатозектомия у одной из крыс в парабриозе вызывает увеличение печени у второй (Moolten and Bucher, 1967). По-видимому, некий фактор или факторы крови определяют размер печени. Предполагается, что этими факторами являются желчные кислоты, выделяемые печенью и положительно регулирующие рост гепатоцитов (Huang et al., 2006). Частичная гепатозектомия стимулирует выход желчных кислот в кровь. Получая желчные кислоты, гепатоциты активируют транскрипционный фактор Fxg, способствующий клеточному делению. Мыши без функционального белка Fxg не могут регенерировать печень. Таким образом, желчные кислоты (составляющие относительно небольшой процент выделяемых печенью продуктов), по-видимому, регулируют размер печени, поддерживая определенный объем клеток. Молекулярные механизмы взаимодействия этих факторов, запуска регенерации печени и ее остановки по достижении исходного размера еще предстоит открыть.

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

Главное, ребята, сердцем не стареть!

Млекопитающие, в том числе люди, способны к регенерации кончиков пальцев при условии, что организм достаточно молод. Как и в регенирующей конечности саламандры, на кончике пальца



образуется бластема из клеток-предшественников, и новый эпидермис регенерирует из ограниченных эктодермой прогениторных клеток, в то время как новая кость происходит из предшественников остеобластов (Fernando et al., 2011; Lehoczy et al., 2011; Rinkevich et al., 2011). Способность к регенерации, наблюдаемая у молодых, не ограничена кончиками пальцев. У мышей может также регенерировать ткань сердца, но только в первую неделю после рождения. В дальнейшем эта способность теряется. Предполагается, что такая утрата регенерации с возрастом связана с временным выходом клеток из клеточного цикла, который можно наблюдать в дифференцирующихся кардиомиоцитах (Porrello et al., 2011). В то же время известно, что кардиомиоциты взрослых млекопитающих (как и у взрослых *Danio*) отвечают на инфаркт возвращением в клеточный цикл, возможно, внося вклад в заживление повреждения (Senyo et al., 2013).

Может быть, регенерация у млекопитающих не столь отличается от присущей рыбам или саламандрам? Недавно было показано, что способность к регенерации сердца у новорожденных мышей зависит от его иннервации. Не напоминает ли это потребность в иннервации в ходе регенерации конечности саламандры? (См. рис. 22.31.) Схожим образом

у новорожденных мышей механическая денервация или химическое ингибирование работы холинэргических нейронов препятствует и пролиферации клеток миокарда, и регенерации ткани сердца. Более того, в эпикарде поврежденного сердца новорожденных мышат (как и при регенерации конечности саламандры) растет уровень нейрегулина 1, но его экспрессия утрачивается в случае денервации сердца. Неуместная экспрессия нейрегулина 1 (совместно с фактором роста нервов) в поврежденном денервированном сердце новорожденной мыши может восстановить его регенерационную способность (Mahmoud et al., 2015). Такая зависимость от иннервации, как и роль сигнального пути нейрегулина 1, сохранена и в ходе регенерации сердца *Danio*. Далее, по-видимому, сигнальный путь нейрегулина может действовать и как митогенный сигнал в неповрежденном сердце, вызывая гиперплазию (увеличение числа клеток) миокарда, приводящую к аномально большому его размеру (Gemberling et al., 2015). Эти данные указывают на сигнальный путь нейрегулина как на консервативный механизм нейрального контроля регенерации; однако его митогенный потенциал предполагает, что над этой системой должны существовать значительные регуляторные надстройки для ее включения во время повреждения и выключения после завершения регенерации.

Иглистые мыши: грань между регенерацией и образованием рубца

Во время экологических полевых работ в Кении доктор Эшли Сейферт краем уха услышал о живущей там мыши, которая может практически «выпрыгнуть из собственной кожи». Сколь бы жутковатой ни казалась эта картина, африканская иглистая мышь (*Acomys cahirinus*) в самом деле может сбрасывать крупные куски во всю толщину кожи (с эпидермисом и дермой), предположительно, в качестве эволюционного механизма защиты от хищников (рис. 22.39А). К счастью для мыши, она способна терять кожу и одновременно отращивать ее вновь без образования каких-либо нежелательных рубцов (Seifert et al., 2012; Seifert and Muneoka, 2018). Сейферт с коллегами показали это, вырезая отверстие диаметром 4 мм в наружном ухе мыши по методу, который часто используют для мечения экспериментальных животных. Наблюдая заживление повреждений, исследователи подтвердили,

что иглистые мыши могут регенерировать эпидермальные и дермальные составляющие уха без рубца (рис. 2.39Б–Д), в то время как нерегенерирующие виды, включая обычных модельных мышей (*Mus musculus*), и линия Murphy Roths Large (MRL/MpJ), известная высокой способностью к заживлению, могли лишь частично закрыть рану фиброзным рубцом (Gawriluk et al., 2016).

В начале главы мы отметили, что одним из основных различий между процессами восстановления и механизмами, задействованными в эмбриональном развитии, является активное участие иммунной системы в ходе регенерации (см. рис. 22.4). Макрофаги хорошо известны в качестве локальных медиаторов воспалительного и репаративного ответов как в случае образования рубца, так и в случае регенерации. Было показано, что они требуются для образования бластемы и успешной регенерации конечности саламандры и плавника *Danio* (Godwin et al., 2013; Petrie et al., 2014). Схожим образом истощение пула макрофагов у иглистых мышей угнетает регенерацию отверстия в наружном ухе (рис. 22.39Е). Показано также, что в ходе нормальной регенерации отверстия в ухе иглистых мышей макрофаги присутствовали на границе бластемы, но почти не проникали внутрь (Simkin et al., 2017). Как же могла работа этих клеток влиять на процесс регенерации?

Обдумывая ответ, стоит учитывать, что не все макрофаги одинаковы. Они способны переключать фенотип в соответствии с текущими потребностями, флуктуируя между основными типами — воспалительным и восстановительным (макрофаги M1 и M2 соответственно). Известно, что эти типы макрофагов экспрессируют и выделяют важные факторы, способные как усиливать образование рубца, например увеличивая синтез коллагенов, так и подавлять фиброз, активируя металлопротеиназы матрикса, призванные разрушать коллаген и другие его компоненты. Согласно лидирующей гипотезе, у способных к регенерации млекопитающих первоначальное вовлечение макрофагов поддерживает благоприятную для регенерации среду, допускающую образование бластемы. Ограниченные же регенерационные способности других позвоночных, в том числе человека, могут быть результатом первичного ответа макрофагов, индуцирующего воспаление и образование рубца. Неудивительно, что большое внимание в исследованиях регенерации и разработке подходов в регенеративной медицине в настоящее время уделяется выработке понимания роли макрофагов и состава внеклеточного матрикса (Londono and Badylak, 2015; Costa et al., 2017).

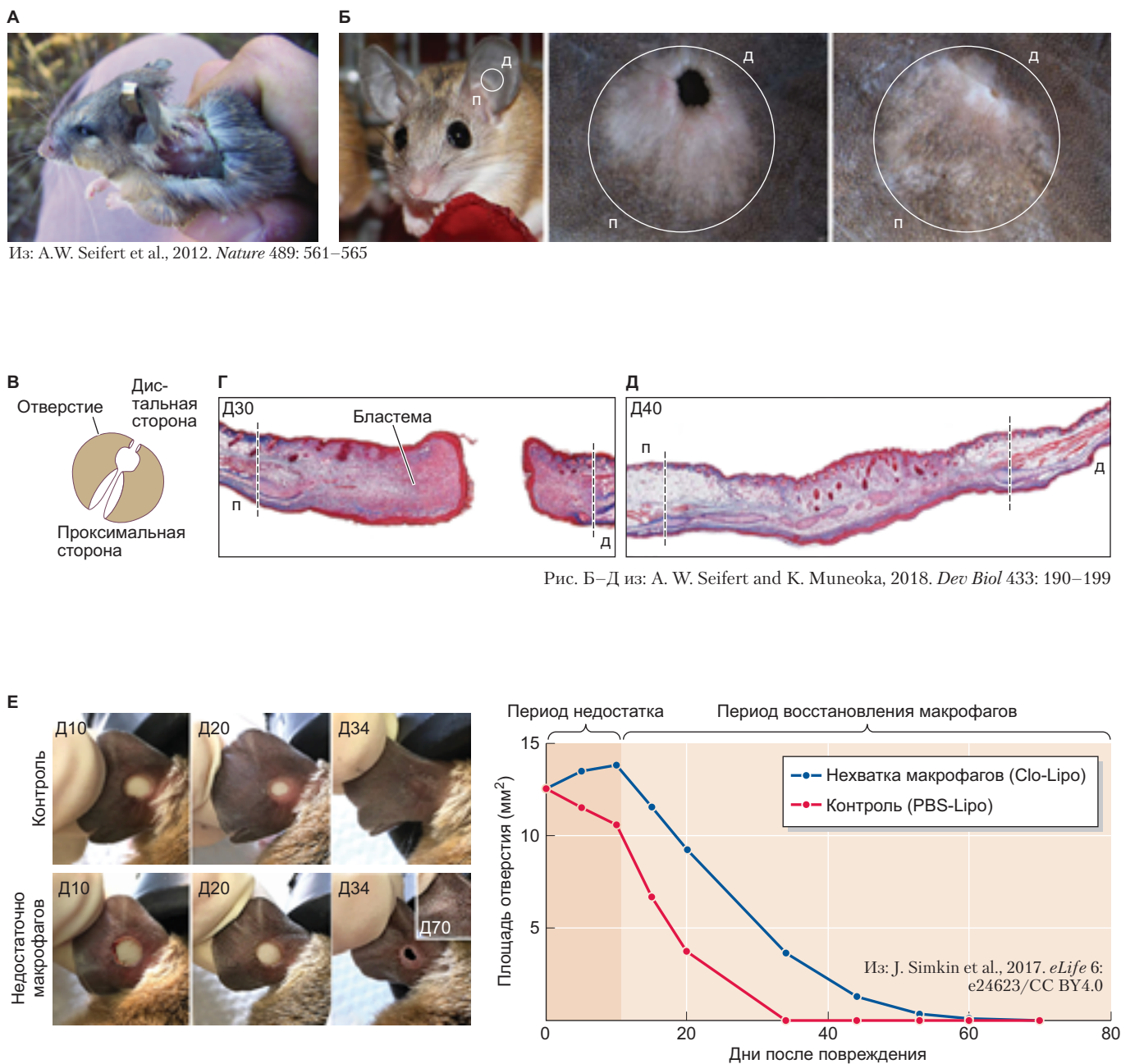
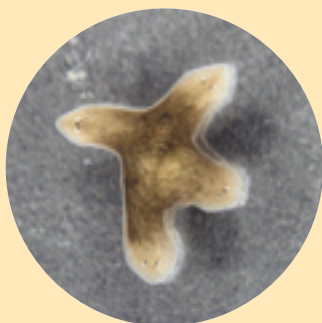
Рис. Б–Д из: A. W. Seifert and K. Muneoka, 2018. *Dev Biol* 433: 190–199

Рис. 22.39. У иглистых мышей вместо образования рубца происходит регенерация. **А.** Кожа иглистых мышей чрезвычайно хрупкая и отрывается полностью, до мышц. **Б.** Прорезание четырехмиллиметрового отверстия в ушной раковине предоставляет удобную модель для изучения регенерации сложной ткани у млекопитающих. На среднем и правом изображении показано отверстие в ушной раковине через 30 и 40 дней после нанесения соответственно. **В.** Регенерация происходит преимущественно в проксимальной половине отверстия, именно там формируется наиболее заметная бластема. **Г.** 30 дней после повреждения. **Д.** К 40 дням после повреждения регенерация завершается и все типы ткани присутствуют. **Е.** Удаление макрофагов путем введения липосом с клодронатом (Clo-Lipo) подавляет регенерацию ушной раковины у иглистых мышей (изображения *слева*; 10, 20, 34 и 70 дней) до окончания воздействия. Когда со временем макрофаги восстанавливаются, то же происходит с регенерационной способностью (*справа*). Пунктирные линии на рис. Г и Д обозначают границы повреждения; п — проксимальная сторона; д — дистальная сторона; PBS-Lipo — контроль с фосфатно-солевым буфером



С разрешения: Junji Morokuma
и Michael Levin

О фотографии в начале главы

После прочтения главы вы уже должны узнать на этом изображении планарию с дополнительными головами. Изображение было получено в лаборатории Майкла Левина после изменения биоэлектрического состояния червя в ходе регенерации. Идея двойственной, движимой эпигенетическими и генетическими факторами, карты позиционной информации, возможно, представляет собой наиболее вдохновляющую и трудную проблему в области развития и регенерации. Понимание того, как клетки и ткани отдельного организма могут интерпретировать повреждения и координировать адекватный масштаб регенерации, можно без преувеличения назвать чудом.

22

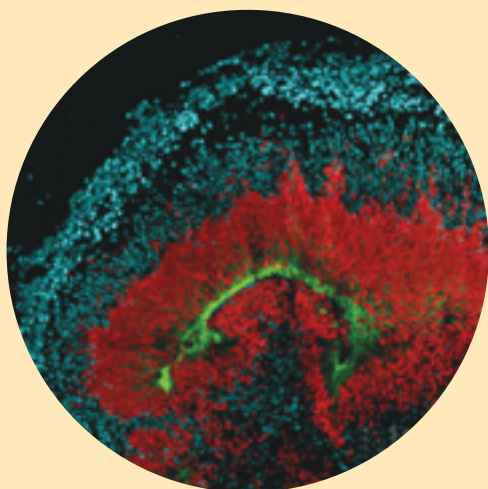
Коротко Регенерация

1. Существует четыре режима регенерации. При регенерации за счет стволовых клеток (характерной для планарий) новые клетки постоянно производятся для замещения погибающих. При эпиморфозе (наблюдаемом в регенерирующих конечностях саламандр и плавниках рыб) из тканей формируется регенерационная бластема, которая пролиферирует и редифференцируется в новую структуру. При морфаллаксии (характерном для гидр) имеет место реорганизация существующих тканей с умеренным ростом или без него. При компенсаторной регенерации (как в печени млекопитающих) клетки делятся, но сохраняют дифференцированное состояние.
2. Регенерацию можно наблюдать у губок, которые могут быть близки к нашим древнейшим предкам. Тем не менее еще предстоит выяснить, получены все существующие ныне регенерационные способности от одного общего предка или же древо жизни заполнено примерами конвергентной эволюции регенерации.
3. Растения могут следовать по прямому и по непрямому пути тотипотентной регенерации — через трансдифференцировку зрелой ткани или посредством образования новых меристем.
4. По всей видимости, у гидры присутствуют градиент активатора головы и градиент активатора подошвы.
5. Регенерация у планарий происходит путем образования бластемы из плюрипотентных клоногенных необластов. Градиенты генов контроля положения, таких как *Wnt*, по-видимому, управляют дифференцировкой этих клеток вдоль передне-задней оси согласно паттерну, который регулирует экспрессирующийся в голове ингибитор *Wnt* *Notum*.
6. В бластемах регенерирующих конечностей амфибий клетки не становятся мультипотентными. Скорее всего, они сохраняют свою специализацию: хрящ возникает из присутствующего в культе хряща, нейроны — из нейронов, мышцы — из мышечных волокон или стволовых клеток мышечной ткани.
7. Такие митогены, как нейрегулин 1, продуцируются прорастающими нервами и способны к индукции регенерации конечности даже в отсутствие самих нервов. Регенерация конечности саламандры, по-видимому, использует ту же систему организации, что действует в развитии конечности.
8. У *Danio* было обнаружено множество моделей регенерации. Дистальная регенерация плавника происходит в основном за счет дедифференцировки существующих клеточных типов с последующей активной пролиферацией бластемоподобного образования. Сердечная ткань *Danio* использует режим эпиморфоза на начальном этапе с последующим периодом компенсаторной регенерации с пролиферацией и трансдифференцировкой.
9. В печени млекопитающих не образуется регенерационная бластема, и объем регенерата соответствует утраченному. Каждая клетка, по-видимому, производит клетки своего типа. Резервная популяция мультипотентных предшественников делится в тех случаях, когда эти ткани не способны регенерировать утраченные части.
10. Африканская иглистая мышь позволила выявить важность макрофагов в поддержании среды для регенерации, предотвращающей фиброз и образование рубца.

Нормальное развитие и патология:

врожденные дефекты, вещества, нарушающие эндокринную систему, и онкологические заболевания

«Мозг», сформированный стволовыми клетками, имеет слои, схожие со слоями нормального мозга. Как может вирус, вроде вируса Зика, руководить развивающимися нейронами?



Из: Nowakowski et al., 2016. *Cell Stem Cell* 18: 591–596

«Что касается развития млекопитающих, — заметила британский медицинский генетик Вероника ван Хейнинген (2000), — удивительно не то, что иногда оно протекает с нарушениями, а то, что оно, вообще, завершается успехом». Действительно, вызывает удивление, что кое-кто из нас присутствует на этом свете, потому что сравнительно немногочисленные зачатия у человека приводят к успешному развитию вплоть до рождения. Исследования фертильности показывают, что только 20–50% человеческих эмбрионов на стадии делений дробления успешно имплантируются в матку (Mantzouratou and Delhanty 2011; Chavez et al., 2012). Многие эмбрионы имеют хромосомные аномалии, которые проявляются настолько рано, что эмбрионы погибают еще до того, как женщина осознает, что забеременела. Согласно исследованиям, проведенным в 1980-х гг., только около 40% успешно имплантировавшихся эмбрионов доживают до родов (Edmonds et al., 1982; Boué et al., 1985). Показано, что заметные врожденные пороки имеют 2,5% родившихся в срок младенцев (Winter 1996; Epstein 2008).

Хотя организм имеет замечательные резервные и дублирующие системы, которые обеспечивают ему значительную гибкость развития, аномальные фенотипы все же могут возникать. Выделяют три основные причины патологического развития:

1. **Генетические механизмы.** Развитие могут нарушать генные мутации или изменения числа хромосом.
2. **Механизмы, обусловленные окружающей средой.** Агенты из внешней среды (обычно химические вещества) вызывают неблагоприятные фенотипические изменения, ингибируя или усиливая сигналы, контролирующие развитие.
3. **Стохастические (случайные) события.** Случай может играть роль в определении фенотипа, и не-

которые аномалии развития — это просто результат «невезения».

Большая часть этой главы посвящена генетическим эффектам и воздействиям окружающей среды¹. Начнем, однако, с краткого рассмотрения роли случайных событий.

Роль случая

Хотя врачи и исследователи часто делят аномалии развития на те, которые вызваны внутренними (генетическими) причинами, и на те, которые вызваны внешними агентами (окружающей среды), сейчас больше внимания в возникновении пороков развития стали уделять роли стохастических факторов — случайности (Molenaar et al., 1993; Holliday, 2005; Smith, 2011). Даже эмбрион с неповрежденным геномом и находящийся в благоприятных условиях среды может сформировать аномальный фенотип в результате «невезения». Результат развития более вероятностен, чем преддетерминирован (Wright, 1920; Gottlieb, 2003; Kilfoil et al., 2009). Рассмотрим, например, инактивацию X-хромосомы у женщин (см. гл. 6). Если у женщины одна нормальная и одна мутантная аллель сцепленного с X-хромосомой гена фактора свертываемости крови, статистически следует ожидать, что аллель дикого типа будет инактивирован приблизительно в 50% ее клеток. Если аллель дикого типа инактивирован в 50% клеток печени, которые продуцируют фактор свертываемости крови, женщина будет фенотипически нормальной. Однако что будет, если случайно 95% X-хромосом дикого типа в этих клетках печени окажутся инактивированы? Только 5% X-хромосом такой женщины будут экспрессировать аллель дикого типа, и у нее могут возникнуть аномалии. Действительно, известны случаи женщин — однояйцевых близнецов, когда у одной из них случайность привела к тому, что значительный процент ее X-хромосом, несущих нормальный аллель фактора свертываемости крови, был инактивирован и у нее развивалась жестокая гемофилия (неспособность крови свертываться). Другой близнец (с низким процентом инактивации нормальных X-хромосом) при этом не страдал (Tiberio, 1994; Valleix et al., 2002).

Такая вариабельность не ограничивается генами X-хромосомы. Измерения экспрессии генов в индивидуальных клетках показывают, что синтез белка представляет собой стохастический процесс со случайными флуктуациями и в транскрипции, и в транс-

ляции, приводящими к вариациям в уровне продуцируемого белка в каждый данный момент времени (Raj and van Oudenaarden, 2008; Stockholm et al., 2010). Детерминация клеток, сигнализация в ходе развития и миграция клеток могут подвергаться воздействию случайных флуктуаций числа факторов транскрипции, паракринных факторов и рецепторов, продуцируемых в определенные моменты. Таким образом, генетически идентичные животные, развивавшиеся в совершенно одинаковых условиях, могут иметь существенно различающиеся фенотипы (Gilbert and Jorgensen, 1998; Vogt et al., 2008; Ruvinsky, 2009; Zhou et al., 2013). Недавние исследования показали, что у многих насекомых отсутствие определенных симбиотических бактерий может вызывать врожденные пороки (Kikuchi et al., 2018).

Генетические ошибки в развитии человека

Аномалии, вызванные собственно генетическими причинами, могут возникать в результате мутаций, анеуплоидий (неправильного числа хромосом) или транслокации хромосом (Opitz, 1987).

Развитие и природа генетических синдромов у человека

Врожденные пороки у человека в диапазоне от угрожающих жизни до относительно легких часто объединяют в **синдромы** (в пер. с греч. — стечение, совместное проявление), с каждым из которых связаны жестокие аномалии. Синдромы, основанные на генетических нарушениях, вызывают либо (1) события, связанные с хромосомами (такие как анеуплоидия), при которых несколько генов утрачиваются или добавляются, либо (2) **плейотропию** — формирование нескольких эффектов одним или парой генов (Grüneberg, 1938; Hadorn, 1955). Говорят, что синдромы обладают *мозаичной плейотропией*, когда ее эффекты продуцируются независимо в результате активности генов, критичных для развития различных частей организма. Например, ген KIT экспрессируется в стволовых клетках крови, пигментных стволовых клетках и эмбриональных стволовых генеративных клетках, в которых он запускает пролиферацию. Если этот ген поврежден, то формирующийся в результате синдром включает анемию (отсутствие эритроцитов), альбинизм (отсутствие пигментных клеток) и стерильность (отсутствие половых клеток).

Синдром именуют *относительно плейотропным*, когда дефектный ген в одной из частей эмбриона вызывает нарушения в другой его части, даже если ген в этой последней ткани не экспрессируется. Например, нарушение экспрессии гена *MITF* в пиг-

¹ Эта глава сфокусирована на вопросах здоровья человека и дает общую информацию по различным медицинским вопросам. При этом она не предназначена для того, чтобы давать медицинские советы конкретным личностям или о конкретных заболеваниях. О более подробных сведениях, касающихся развития и заболеваний, см. Gilbert and Epel, 2015.

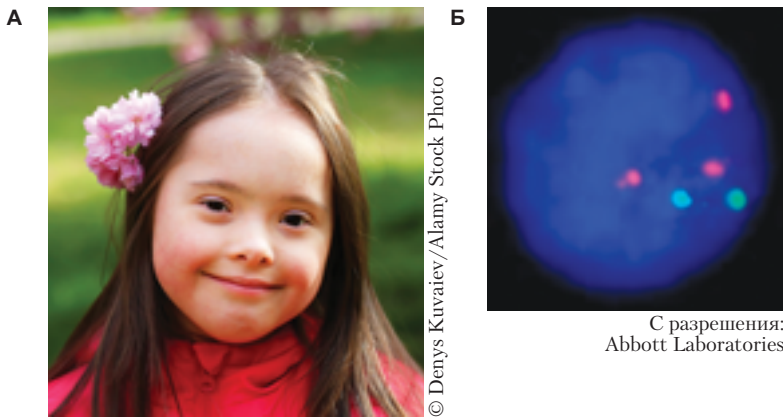


Рис. 23.1. А. Для синдрома Дауна, вызванного наличием третьей копии 21-й хромосомы, характерны особый тип лица, когнитивные нарушения, отсутствие носовой кости и часто дефекты сердца и желудочно-кишечной сферы. Б. Результаты окрашивания ядер, показанные здесь, выявляют число хромосом с помощью флуоресцентно меченных зондов, которые связываются с ДНК на 21-й хромосоме (розовая окраска) и 13-й (голубая). Данный пациент страдает синдромом Дауна (трисомия 21), но имеет две нормальные копии 13-й хромосомы

ментном эпителии сетчатки препятствует полной дифференцировке этой структуры. Такое нарушение в свою очередь вызывает неправильное формирование эмбриональной глазной щели, приводящее к утечке влаги стекловидного тела. Без этой жидкости глаз не может увеличиваться, что приводит к микрофтальму (уменьшенному размеру глазных яблок). При этом уменьшен хрусталик и роговица, хотя в них самих *MITF* не экспрессируется.

Мозаичные синдромы могут быть результатом **анеуплоидий** — изменения числа некоторых хромосом. Даже единственная дополнительная копия маленькой 21-й хромосомы (**трисомия 21**) нарушает множество функций в развитии: вызывает целый ряд аномалий, среди которых изменения в лицевых мышцах, сердце и кишечнике, а также проблемы психического развития, в целом именуемые **синдромом Дауна** (рис. 23.1). Определенные гены в 21-й хромосоме кодируют факторы транскрипции и регуляторные микроРНК, а излишняя копия 21-й хромосомы, вероятно, вызывает избыточную продукцию этих регуляторных факторов (Bras et al., 2018). Избыточная продукция приводит к нарушению регуляции генов, необходимых для формирования сердца, мышц и нервов (Chang and Min, 2009; Korbel et al., 2009; Antonarakis et al., 2017). Одну из таких регуляторных микроРНК, *miRNA-155*, кодируемых 21-й хромосомой, обнаруживают во всем развивающемся человеческом плоде. Она подавляет передачу сигналов определенных факторов транскрипции, необходимых для нормального развития нервов и сердца, а ее уровень значительно повышен в мозге и сердце людей, страдающих синдромом Дауна (Elton et al., 2010; Wang et al., 2013).

Генетическая и фенотипическая гетерогенность

При плейотропии один и тот же ген может вызывать различные эффекты в разных тканях. Однако противоположный феномен является в равной степе-

ни важной чертой генетических синдромов: мутации в разных генах могут давать одинаковые фенотипы. Если несколько генов являются частью одного пути передачи сигнала, мутации в каком-либо из них часто дают схожие фенотипические результаты. Такую продукцию схожих фенотипов вследствие мутаций в разных генах называют **генетической гетерогенностью**. Синдром стерильности, анемии и альбинизма, вызываемый отсутствием белка Kit (описан выше), может также быть вызван отсутствием его паракринного лиганда, фактора стволовых клеток (SCF). Например, при циклопии¹ (рис. 4.23В) фенотип может возникнуть в результате мутации либо гена *Sonic hedgehog* (*Shh*), либо генов, активируемых *Shh*, либо генов, контролирующих синтез холестерина (поскольку холестерин важен для сигнализации *Shh*).

Не только один и тот же фенотип может быть получен в результате разных мутаций, но и одна и та же мутация может давать разные фенотипы у разных индивидов — феномен, известный как **фенотипическая гетерогенность** (Wolf, 1995, 1997; Nijhout and Paulsen, 1997). Фенотипическая гетерогенность возможна, поскольку гены не являются автономными факторами. Напротив, они взаимодействуют с другими генами и продуктами активности этих генов, интегрируясь в сложные пути и сети процессов. Так, были проанализированы фенотипы, возникающие при одной и той же мутации в гене *FGFR3* в 10 неродственных семьях (Bellus et al., 1996). Эти фенотипы находились в диапазоне от относительно умеренных до потенциально летальных аномалий. Дефекты гена, продуцирующего миозин-7, обычно вызывают дегенерацию слуховых и зрительных нейронов, приводящую к синдрому слепоты и глухоты. Однако нобелевский лауреат молекулярный биолог Джеймс Уотсон (James Watson), у которого были обнаружены такие мутантные гены, не имел проблем ни со слухом, ни со зрением (Green and Annas, 2008).

¹ Тоже порок развития циклоцефалии, при котором глазные яблоки сращены и располагаются в одной глазнице по средней линии лица.

ТАБЛИЦА 23.1. Некоторые агенты, которые могут вызывать нарушения развития человеческого плода^a**ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ И ХИМИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА**

Алкоголь
 Аминогликозиды (гентамицин)
 Аминоптерин
 Антииреоидные агенты (пропилтиоурацил — PTU)
 Бром
 Кортизон
 Диэтилстильбэстрол (DES)
 Дифенилгидантоин
 Героин
 Свинец
 Метилртуть
 Пеницилламин
 Ретиноевая кислота (изотретиноин, аккутан)
 Стрептомицин
 Тетрациклин
 Талидомид
 Триметадон

Вальпроевая кислота

Варфарин

ИОНИЗИРУЮЩЕЕ ИЗЛУЧЕНИЕ (РЕНТГЕНОВСКИЕ ЛУЧИ)**ГИПЕРТЕРМИЯ (ЛИХОРАДКА)****ИНФЕКЦИОННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ**

Вирусы Коксаки
 Цитомегаловирус
 Вирус герпеса *Herpes simplex*
 Парвовирус
 Краснуха (германская корь)
Toxoplasma gondii (токсоплазмоз)
Treponema pallidum (сифилис)
 Вирус Зика

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У МАТЕРИ

Аутоиммунное заболевание (включая резус-конфликт)
 Диабет
 Недостаточное питание, голодание
 Фенилкетонурия

^aДанный список включает известные и возможные тератогенные факторы и не является исчерпывающим.

Тератогенез: атаки среды на развитие животного

Лето 1962 г. принесло два зловещих события. Первым была публикация фундаментального исследования Рэйчел Карсон «Безмолвная весна» (Rachel Carson «Silent Spring»), в которой она доказала, что пестицид ДДТ уничтожает птичьи яйца и подавляет репродукцию нескольких видов животных. Ее работе приписывают роль в развитии современного движения в защиту окружающей среды. Вторым событием стало открытие того, что талидомид, седативный препарат, используемый для облегчения ведения беременности, может вызывать аномалии конечностей и уха в человеческих плодах (Lenz, 1962; см. гл. 1)¹. Эти два разоблачения показали, что эмбрион уязвим для факторов окружающей среды. Действительно, Рэйчел Карсон связала их, указав: «Это все одно и то же — талидомид и пестициды. Они демонстрируют наше стремление идти вперед и использовать для этого все, не зная, к чему оно приведет» (Carson, 1962).

Экзогенные факторы, вызывающие врожденные пороки, именуют **тератогенами** (табл. 23.1). Большинство тератогенов эффективны в течение определенных критических периодов времени. Развитие человека обычно подразделяют на эм-

бриональный (зародышевый) период (до конца 8-й недели беременности) и **фетальный (плодный) период** (остальной внутриутробный период). Большинство систем органов формируется в эмбриональном периоде; в фетальном периоде в основном происходит рост и формообразование. Таким образом, восприимчивость плода к тератогенам максимальна между 3-й и 8-й неделями развития (рис. 23.2). Нервная система, однако, формируется непрерывно и остается восприимчивой в течение всего развития. До 3-й недели воздействие обычно не вызывает врожденных аномалий, поскольку тератоген в этот период повреждает большинство клеток эмбриона или все без исключения, что приводит к его смерти, либо убивает только несколько клеток, что позволяет эмбриону полностью восстановиться.

Крупнейший класс тератогенов включает лекарственные препараты и химические вещества. Вирусы, радиация, высокая температура тела и метаболические нарушения у матери также могут действовать как тератогены. Врожденные пороки вызывают некоторые химические вещества, встречающиеся в природе. Например, иервин и циклопамин образуются в растении чемерица *Veratrum californicum* и блокируют сигнализацию Sonic hedgehog, что приводит к циклопии (см. рис. 4.23В). Природный продукт никотин, концентрирующийся в табачном дыме, связан с нарушениями развития легких и мозга (Dwyer et al., 2008; Maritz and Harding, 2011).

Врожденные аномалии вызывают некоторые вирусы. Передаваемый комарами вирус Зика связан с микроцефалией, для которой характерны малые размеры головы и мозга (Centers for Disease Control

¹ Чтобы разобраться в механизме тератогенности талидомида, потребовалось более 50 лет. Оказалось, что талидомид запускает деградацию фактора транскрипции SALL4, который участвует в формировании конечностей и ушей. Мутация SALL4 с утратой функции у человека приводит к таким же типам врожденных аномалий (Donovan et al., 2018).

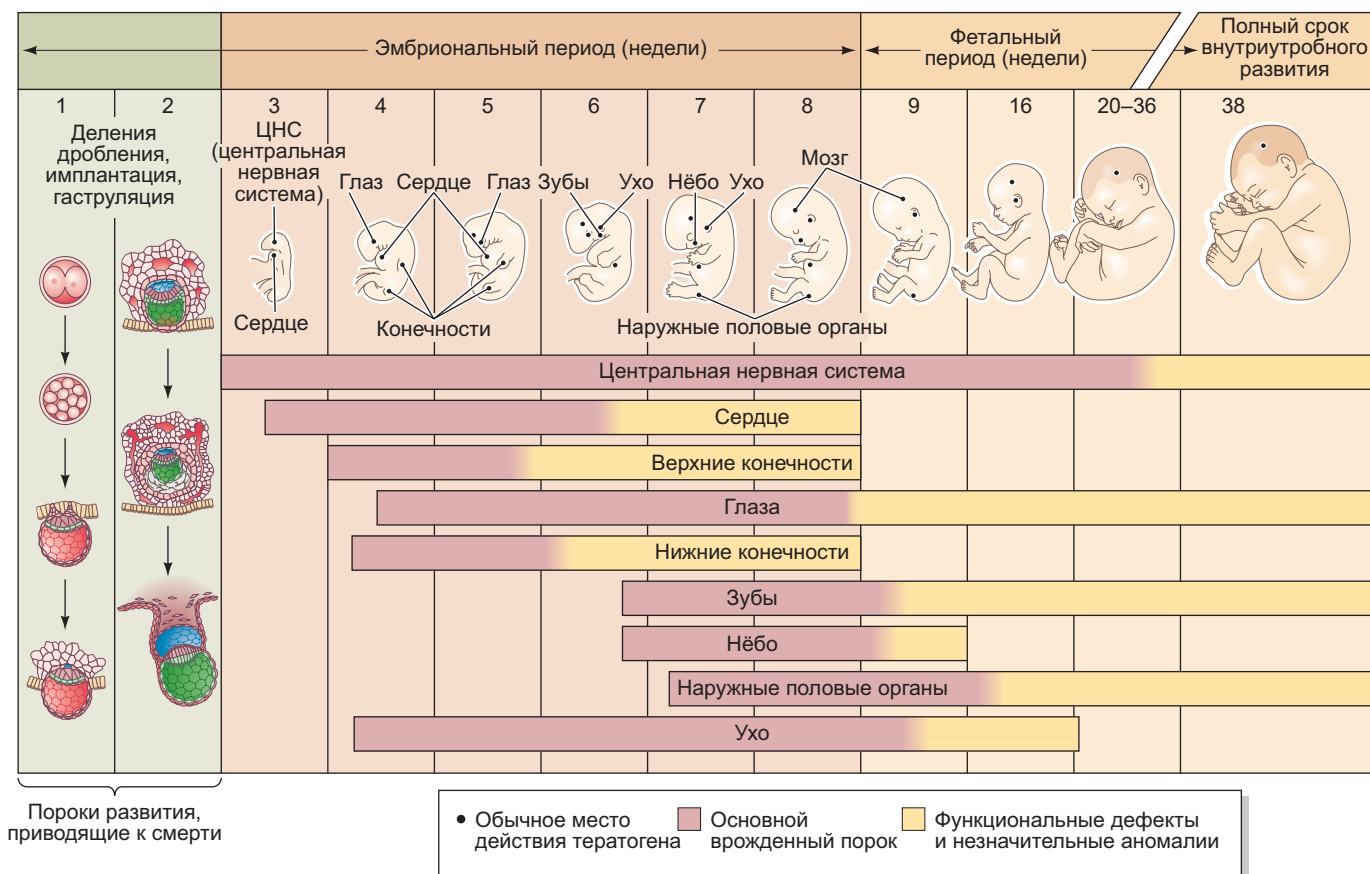


Рис. 23.2. Срок беременности (в неделях) и чувствительность эмбриональных органов к тератогенам. (По данным: K. L. Moore and T. V. N. Persaud, 1993. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*, 5th ed., p. 156. W. B. Saunders: Philadelphia)

and Prevention, 2016; Mlakar et al., 2016). У беременных женщин вирус Зика непосредственно инфицирует нейральные клетки-предшественники коры головного мозга плода, что приводит к их гибели и к уменьшению размеров головы и мозга у новорожденных (Tang et al., 2016; Merfeld et al., 2017). Одна из причин состоит в том, что вирус Зика изменяет уровень микроРНК, приводя к активации путей естественной клеточной смерти и уменьшению клеточных делений стволовых клеток (рис. 23.3; Bhagat et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Различные факторы тератогенны для разных организмов (Gilbert and Epel, 2015); для скрининга соединений, с большой вероятностью опасных, используют лабораторных животных. Шпорцевая лягушка *Xenopus* и рыбка *Danio* (см. гл. 11 и 12) проходят раннее развитие при участии тех же основных путей сигнализации паракринных факторов и факторов транскрипции, что и человек. Эти модельные организмы особенно важны для идентификации тератогенных молекул в окружающей среде. Например, в исследованиях, проведенных на *Danio*, обнаружили, что при взрыве в 2010 г. на буровой вышке Deepwater Horizon в Мексиканском заливе водорастворимые компоненты нефти вызвали многочисленные анома-

лии развития, прослеживаемые вплоть до миграции клеток в нервный гребень (рис. 23.4; de Soysa et al., 2012).



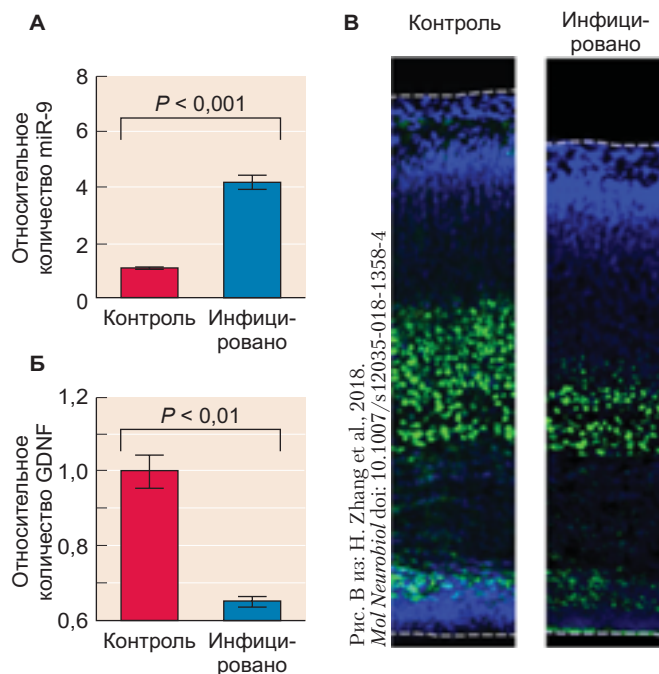
Загадки развития

В США беременных женщин предупреждают, чтобы они не пили воду из озер, расположенных рядом с заброшенными шахтами. Как вы думаете, обоснованы ли эти предупреждения? Если да, то почему?

Алкоголь как тератоген

Судя по численности эффектов и тому, во что это обходится обществу, самым губительным тератогеном, несомненно, является алкоголь (этанол). Дети, родившиеся с **алкогольным синдромом плода** (часто именуемым **синдромом пьяного зачатия, АСП**), имеют малый размер головы, сглаженный губной желобок (пара валиков между носом и ртом над серединой верхней губы), узкую красную кайму верхней губы и заниженную переносицу (Lemoine et al., 1968; Jones and Smith, 1973).

Рис. 23.3. Возможный механизм клеточной смерти, вызываемой вирусом Зика. Мозг мышинных плодов инфицировали вирусом Зика и контролировали в течение нескольких дней. **А.** Инфицирование вирусом Зика усиливает продукцию микроРНК miR-9, которая связана с клеточной смертью и снижает число формирующихся нейронов. **Б.** Последующее снижение уровня глиального нейротрофического фактора (GDNF), фактора роста нервов, который служит мишенью для miR-9. **В.** Уменьшение числа нейронов в коре мозга, инфицированного вирусом Зика. Голубая флуоресценция — ДНК, окрашенная DAPI, а зеленая — Tbr1, маркер новообразованных нейронов. Планка погрешности показывает стандартную ошибку среднего. (По данным: H. Zhang et al., 2018. *Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1358-4>.)



Мозг у таких детей может быть резко уменьшен по сравнению с нормальным и часто хуже развит в результате нарушения миграции нейронов и глии (**рис. 23.5А, Б**; Clarren, 1986). АСП — наиболее распространенный тип синдрома врожденной умственной отсталости, встречающийся примерно у одного из 650 детей, рожденных в США (May and Gossage, 2001). Хотя коэффициент интеллекта IQ у детей с АСП значительно варьирует, в среднем он составляет около 68 баллов (Streissguth and LaDue, 1987). Большинство взрослых и молодых людей, страдающих АСП, не в состоянии обращаться с деньгами и имеют трудности с тем, чтобы учиться на опыте прошлого (Dorris, 1989; Kulp and Kulp, 2000).

Алкогольный синдром плода включает только часть дефектов, вызываемых пренатальным воздействием алкоголя. Термин **фетальный алкогольный спектр нарушений** (ФАСН) был введен, чтобы охватить все встречающиеся патологии и функци-

ональные недостаточности, вызываемые алкоголем. У многих детей с ФАСН поведенческие аномалии не проявляются серьезными отклонениями в размерах головы или заметным снижением IQ (NCBDD 2009). С помощью новых технологий идентифицированы нейральные тракты в мозге и обнаружены тонкие аномалии, которые коррелируют с отклонениями в скорости интеллектуальной обработки данных и исполнительном функционировании (таком как планирование, запоминание и сохранение информации) (рис. 23.5В, Г; Wozniak and Muetzel, 2011).

Как и в случае с другими тератогенами, количество алкоголя и временные рамки его воздействия вместе с генетической наследственностью плода вносят свой вклад в конечный результат развития. Вариабельность способности организма матери метаболизировать алкоголь также может влиять на различия в результатах (Warren and Li,

Рис. 23.4. Водорастворимые компоненты сырой нефти, разлившейся из скважины Deerpwater Horizon, тератогенны для *Danio*. По сравнению с нормальной рыбкой того же возраста, ее эмбрионы, подвергшиеся воздействию компонентов нефти, формировали личинки с серьезными аномалиями развития, включая уменьшение размеров головы, жабр и торакальных хрящей (голубое окрашивание), что связано с миграцией клеток краниального нервного гребня



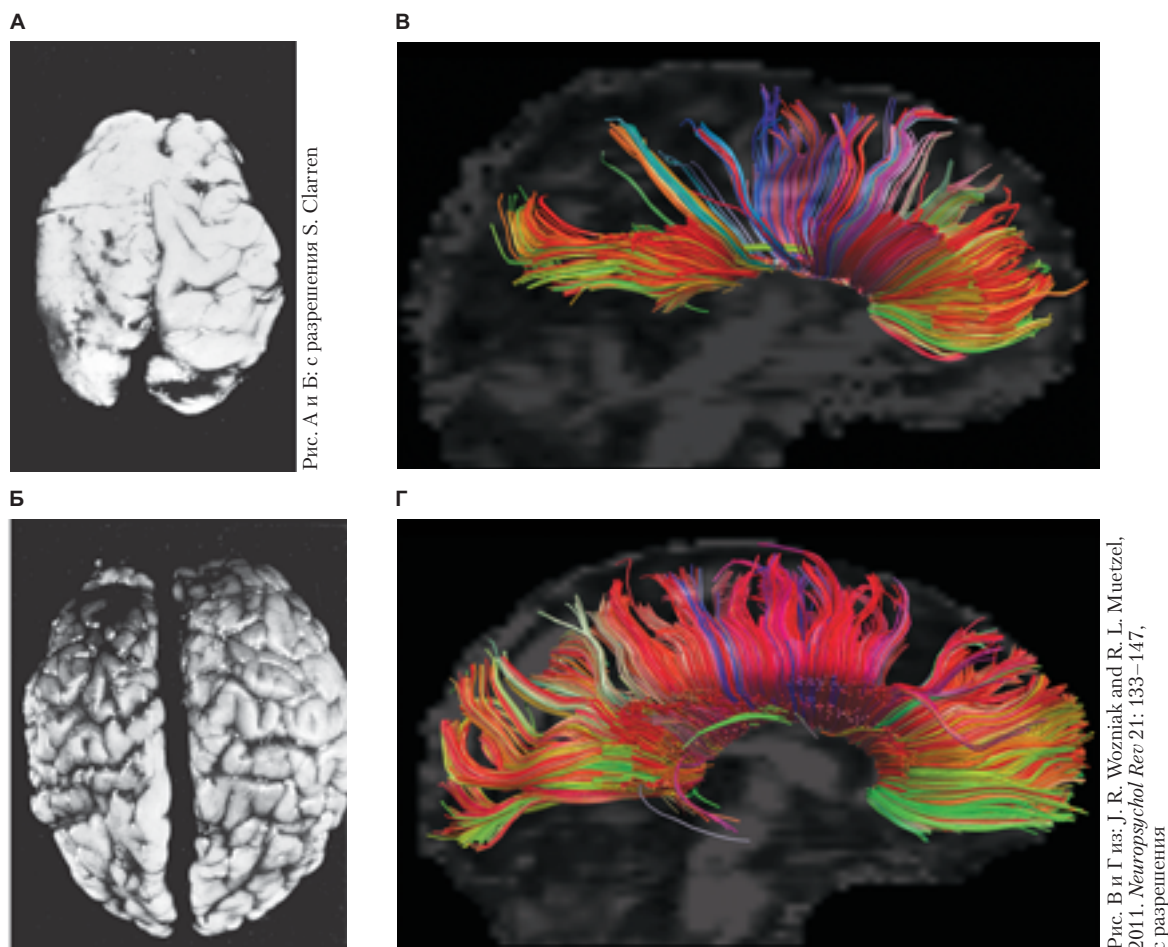


Рис. 23.5. Эффекты алкоголя на мозг плода. Сравнение мозга новорожденного с алкогольным синдромом плода (А) и мозга нормального младенца такого же возраста (Б). Мозг младенца с АСП меньше, и паттерн мозговых извилин искажен глиальными клетками, которые мигрировали в верхнюю часть мозга. В, Г. Специфичные аномалии, локализованные в мозолистом теле, визуализированы с помощью диффузионно-тензорной томографии миелинизированных аксонов. Разница между трактографией нервных волокон у ребенка с ФАСН (В) и здорового ребенка того же возраста (Г) служит основанием предполагать, что имеются существенные аномалии нейронов, которые в норме дают проекции через задние участки мозга в кору теменной и височной долей.

2005). Хотя ФАСН наиболее сильно связан с высоким уровнем потребления алкоголя, результаты лабораторных исследований на животных позволяют предполагать, что даже единичный эпизод употребления эквивалента двух спиртных напитков в ходе беременности может приводить к гибели клеток мозга плода (рис. 23.6; Sulik, 2005). (Один спиртной напиток определяется как 12 унций¹ пива, 5 унций вина или 1,5 унции крепкого алкоголя.) Важно отметить, что алкоголь может вызывать перманентное повреждение плода в то время, когда большинство женщин еще не осознают, что беременны.

¹ Унция — 28,35 г, т. е. приблизительно 330 мл пива, 140 г вина и 40 г крепкого алкоголя

РАЗВИВАЕМ ТЕМУ

КАК АЛКОГОЛЬ ВЛИЯЕТ НА РАЗВИТИЕ: ДАННЫЕ, ПОЛУЧЕННЫЕ НА МЫШАХ

Если мышь подвергать воздействию алкоголя в период гастрюляции, этанол вызывает дефекты лицевой части черепа и мозга, которые сравнимы с таковыми у человека, страдающего АСП (рис. 23.6; Sulik, 2005). Как и у человеческих плодов, нос и верхняя губа детенышей, подвергшихся воздействию этанола, развиты хуже, чем в норме, а в нервной системе проблемы представлены незамкнутостью нервной трубки и неполным развитием переднего мозга (см. гл. 13 и 14). Такая

модель АСП на мышах может быть использована в изучении путей, которыми этанол вызывает эффекты в эмбрионе.

Вероятно, алкоголь воздействует на несколько процессов и может влиять на миграцию, пролиферацию, адгезию и выживание клеток. Показано, что в подвергшихся воздействию спирта плодах вместо миграции и деления клетки нервного гребня преждевременно вступают в дифференцировку

лицевых хрящей (Hoffman and Kulyk, 1999). Среди множества генов, которые подвергаются вследствие воздействия алкоголя на мать, у мышей имеется несколько таких, которые кодируют белки, вовлеченные в движение клеток и рост нейронов (Green et al., 2007). На поздних стадиях при воздействии этанола на эмбрионы мышей гибель клеток, происходящих из нервного гребня, можно наблюдать уже через 12 ч после приема алкоголя.

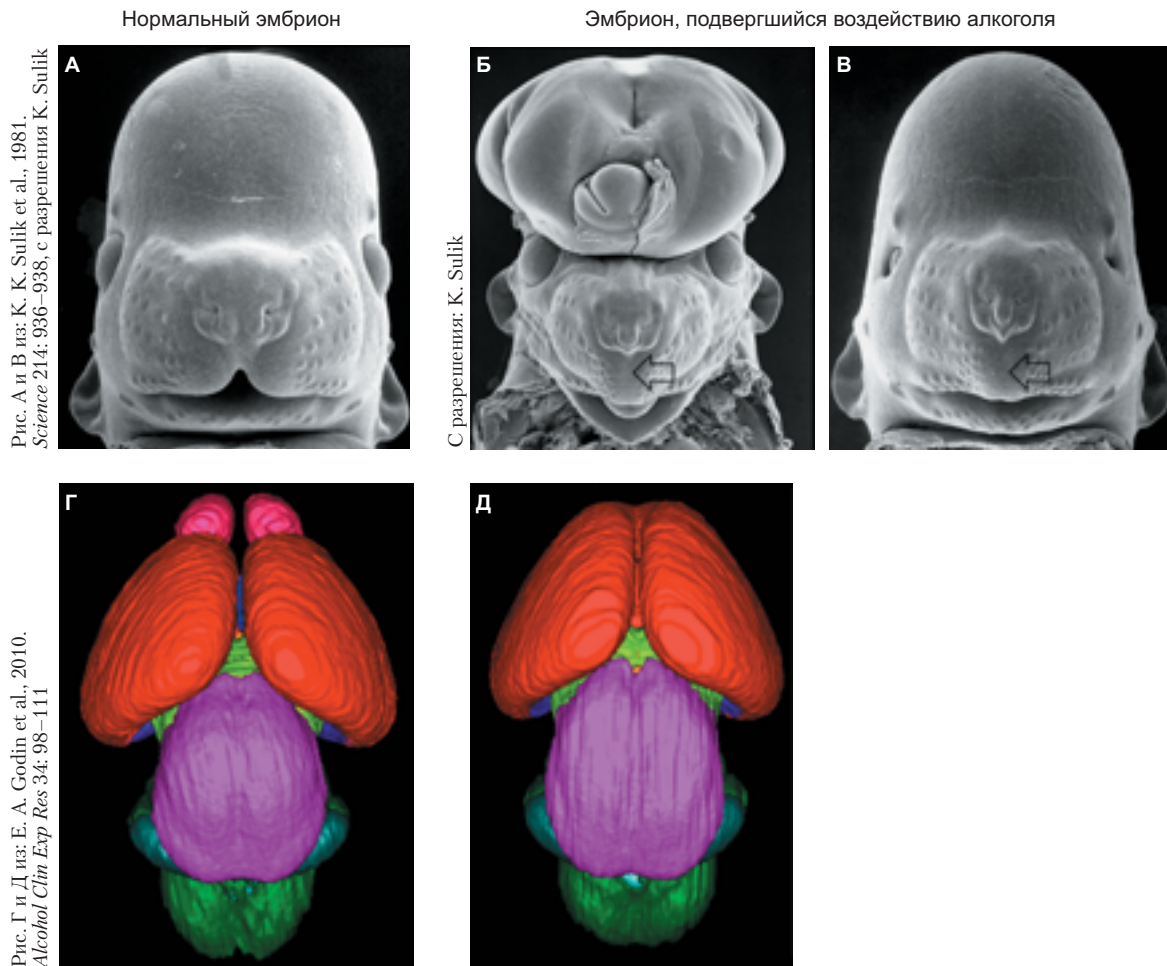


Рис. 23.6. Черепно-лицевые и мозговые аномалии у мышей, вызванные алкоголем. Нормальный (А) и аномальные (Б, В) 14-дневные эмбрионы мыши. На рис. (Б) передняя часть нервной трубки не замкнута, что приводит к экзэнцефалии — патологии, при которой ткань мозга открыта во внешнюю среду. На более поздних стадиях развития выступающая часть мозговой ткани разрушается, что приводит к анэнцефалии. Пренатальное воздействие алкоголя может также влиять на развитие лицевой части (Б, В), что приводит к формированию уменьшенного носа и аномальной верхней губы (обозначены *пустыми стрелками*). Такие черты лица являются результатом алкогольного синдрома плода. Г, Д. Трехмерные реконструкции на основе магнитно-резонансных образов мозга нормального (Г) и подвергнутого воздействию алкоголя (Д) 17-дневных эмбрионов мышей. В подвергнутом воздействию алкоголя образце обонятельные луковицы (обозначены *розовым*) отсутствуют, а полушария мозга (*красные*) аномально слиты по средней линии. *Светло-зеленым* показан промежуточный мозг; *пурпурным* — средний мозг; *сине-зеленым* — мозжечок; *темно-зеленым* — мост (варолиев мост) и продолговатый мозг

Когда момент воздействия алкоголя совпадает с третьей и четвертой неделями развития человека, погибают клетки, которые должны сформировать медиальную часть переднего мозга, верхнюю часть середины лица и черепные нервы. Это подтверждено на ранних куриных эмбрионах, в которых кратковременное воздействие этанола в адекватных дозах (около 25 мМ) приводило к резкому сокращению мигрирующих клеток краниального нервного гребня, что вызвало клеточные смерти в области головы (Flentke et al., 2011).

Одной из причин клеточной смерти в эмбрионах мыши служит то, что воздействие алкоголя приводит к формированию пероксидных радикалов, которые могут повреждать клеточные мембраны (рис. 23.7А–В; Davis et al., 1990; Kotch et al., 1995; Sulik, 2005). На модельных системах антиоксиданты эффективно уменьшали и клеточную смерть, и нарушения развития, вызванные алкоголем (Chen et al., 2004).

В основе избыточной клеточной смерти может лежать аномалия сигнализации. В эмбрионах,

подвергшихся воздействию алкоголя, подавлена экспрессия Sonic hedgehog (который важен для установления лицевых структур по средней линии). Хотя механизм подавления остается не полностью понятным, тот факт, что помещение клеток, секретирующих Shh в мезенхиму головы, может предупреждать вызываемую алкоголем смерть клеток краниального нервного гребня, подчеркивает важность сигнального пути Shh как мишени алкогольного тератогенеза (Ahlgren et al., 2002; Chrisman et al., 2004).

Еще один механизм, который, предположительно, вовлечен в алкогольный тератогенез, — это влияние на способность молекулы клеточной адгезии L1 удерживать клетки вместе и передавать друг другу сигналы (Littner et al., 2013). Такое влияние на морфогенез реализуется на уровне белков, а не генов. Показано, что низкий уровень концентрации алкоголя (7 мМ), вызванный в крови и в мозге одной порцией спиртного, может блокировать адгезивные функции белка L1 *in vitro* (Ramanathan et al., 1996) (рис. 23.7Г). Более того,

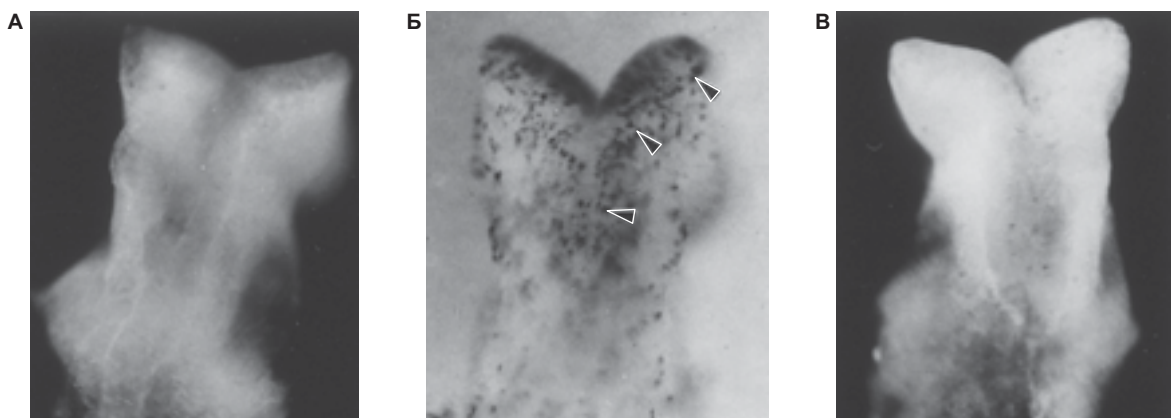
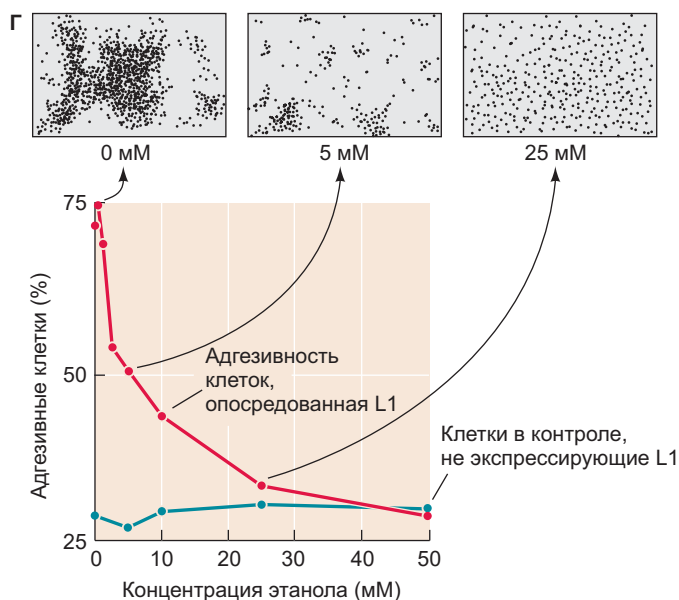


Рис. А и В из: L. E. Kotch et al., 1995. *Teratology* 52: 128–136, с разрешения К. Sulik

Рис. 23.7. Возможные механизмы возникновения алкогольного синдрома плода. А–В. Клеточная смерть, вызванная пероксидными радикалами, образовавшимися под действием алкоголя. Окрашивание сульфатом нильского голубого выявляет области клеточной смерти. А. Головной участок контрольного 9-дневного мышинного эмбриона. Б. Головной участок эмбриона, подвергнутого воздействию алкоголя, демонстрирующий области клеточной смерти (обозначены стрелками). В. Головной участок эмбриона, обработанного и алкоголем, и супероксиддисмутазой — ингибитором пероксидных радикалов. Этот фермент предупреждает вызванную алкоголем клеточную смерть. Г. Ингибирование алкоголем опосредованной L1 адгезии клеток



мутации в гене L1 человека вызывают синдром умственной отсталости и нарушений, схожих с наблюдающимися при тяжелых случаях АСП. Такое воздействие на L1 и утрата нейронов способны приводить к аномальному возбуждению нейронных цепей. Отклонения в нейронной импульсации могут приводить к поведенческим нарушениям и гибели множества нейронов (Granato and Dering, 2018). Таким образом, алкоголь, проходя через плаценту, поступает в плод и блокирует некоторые критически важные функции в развитии мозга и лицевого отдела.

Ретиноевая кислота как тератоген

В некоторых случаях даже вещества, участвующие в нормальном развитии, могут давать вредоносные эффекты, если их оказывается слишком много или они действуют в особые моменты развития. Мы видели в предыдущих главах, что ретиноевая кислота (РК) является производным витамина А, который важен для определения передне-задней оси и формирования челюстей и сердца у эмбрионов млекопитающих. Некоторые исследователи считают, что регионспецифичный гомеостаз РК в эмбрионе во многих отношениях является движущей силой в определении того, в клеточную пролиферацию или дифференцировку направляется развитие. Поэтому концентрация РК должна тщательно контролироваться во времени и пространстве в развивающемся эмбрионе (Piersma et al., 2017).

В фармацевтической форме 13-цис-ретиноевую кислоту (именуемую также изотретиноином и продаваемую под торговой маркой Accutane) применяют для лечения тяжелых случаев кистозной формы угрей и она доступна для этих целей с 1982 г. Однако о вредном воздействии больших доз РК (или ее предшественника — витамина А) на беременных животных известно еще с 1950-х гг. (Cohlan, 1953; Giroud and Martinet, 1959; Kochhar et al., 1984). Около 160 000 женщин детородного возраста (15–45 лет) принимали изотретиноин с тех пор, как он был введен в обращение, и некоторые использовали его во время беременности. В настоящее время лекарственные препараты, содержащие изотретиноин, сопровождаются строгим предупреждением о противопоказании беременным женщинам. В США воздействие ретиноевой кислоты является критически важной угрозой здоровью общества, поскольку существует значительное перекрытие между популяцией, пользующейся лекарствами от акне, и популяцией женщин детородного возраста, а число незапланированных беременностей в США оценивается в 50% (Finer and Zolna, 2011).

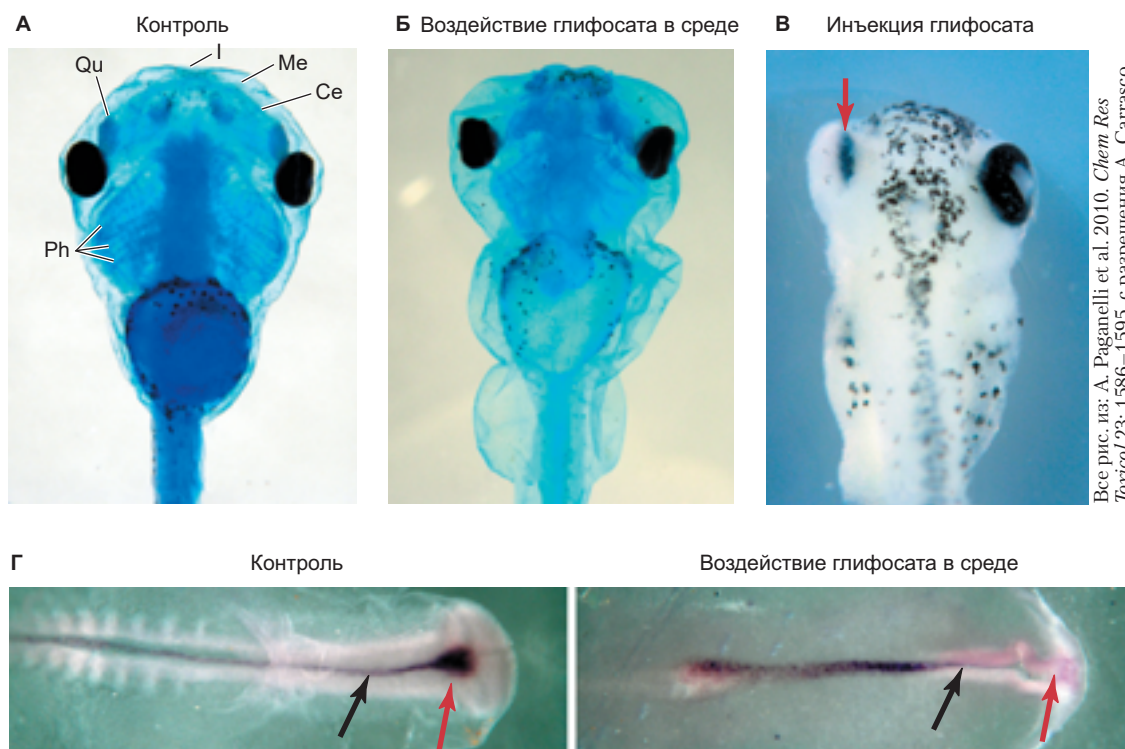
Описано исследование группы женщин, которые по неосторожности принимали РК и тем не менее

приняли решение сохранить беременность (Lammer et al., 1985). Из 59 таких новорожденных 26 не имели каких-либо заметных аномалий, в 12 случаях произошел спонтанный выкидыш, а в 21 случае у новорожденных имелись выраженные аномалии характерного типа. Они включали отсутствие или дефекты ушей, отсутствие или уменьшение размеров челюстей, расщепление нёба («волчья пасть»), аномалии центральной нервной системы, дуги аорты и недостаточность тимуса. Эти аномалии в основном связаны с неспособностью клеток краниального нервного гребня мигрировать в глоточные дуги лица, где они формируют челюсти и уши (Moroni et al., 1994; Studer et al., 1994). Радиоактивно меченная РК связывается с клетками краниального нервного гребня и подавляет их пролиферацию и миграцию (Johnston et al., 1985; Goulding and Pratt, 1986). Тератогенный период, во время которого возможно негативное воздействие на клетки краниального нервного гребня, имеет место у человека на 20–35-й день беременности (соответствует 8–10-му дню у мышей).

Ретиноевая кислота, вероятно, вызывает повреждение этих клеток несколькими путями. Один из механизмов состоит в том, что избыток РК активирует путь отрицательной обратной связи, который обычно обеспечивает нормальный уровень этого соединения в организме. Кратковременные значительные повышения уровня РК, таким образом, активируют синтез фермента, вызывающего деградацию РК, что приводит к длительному *снижению ее уровня*. Именно дефицит РК и приводит к нарушениям развития (Lee et al., 2012). Вот почему большие количества ретиноевой кислоты дают фенотипы, схожие с таковыми, формирующимися при недостатке РК.

Нарушение сигнализации РК может быть опасно для здоровья общества и по другой причине. Показано, что гербициды на основе глифосата (такие как Roundup) усиливают активность эндогенной РК (Paganelli et al., 2010). Когда эмбрионы *Xenopus* инкубировали в растворе, содержащем экологически обоснованную концентрацию этих гербицидов, активация репортерного гена, отвечающего на РК, резко изменялась, а у эмбрионов выявляли дефекты краниального нервного гребня и лицевые нарушения, схожие с наблюдающимися при тератогенезе, вызванном РК (**рис. 23.8**).

Глифосат наиболее широко применяют (и коммерчески выгодно) в Северной Америке, там было использовано более 180 т этого препарата. Он блокирует фермент растений, который критичен для синтеза определенных аминокислот. Одной из серьезных генно-инженерных возможностей было производство гербицида широкого спектра действия, такого как Roundup, а затем селекция растения, устойчивого к такому гербициду. Это означает, что, если вы распылите это вещество над большой территорией,



Все рис. из: A. Paganelli et al. 2010. *Chem Res Toxicol* 23: 1586–1595, с разрешения A. Cattasco

Рис. 23.8. Тератогенность гербицида глифосат. **А.** Головастики *Xenopus*, развивавшийся в контрольных (нормальных условиях), окрашенный альциановым синим для выявления лицевых хрящей. Ph — глоточный; Ce — рогоподъязычный; I — инфраростральный; Me — меккелев; Qu — квадратный. **Б.** Головастики *Xenopus*, развивавшийся в среде с глифосатом в экологически адекватной концентрации и окрашенный аналогичным образом. Его глоточные дуги и срединный лицевой хрящ (производные краниального нервного гребня) развиваются аномально. **В.** Если эмбрион инъецирован таким образом, что только одна его сторона (показана стрелкой) подвергалась воздействию глифосата, то именно на этой стороне возникают аномалии краниального нервного гребня. **Г.** Контрольный куриный эмбрион демонстрирует экспрессию гена *sonic hedgehog* в хорде (показана черной стрелкой) и прехордальной мезодерме (показана красной стрелкой). Куриные эмбрионы, развивавшиеся в глифосате, демонстрируют резкое уменьшение экспрессии *sonic hedgehog* в прехордальной (краниофациальной) мезодерме

то на ней будут уничтожены все растения, кроме резистентных к глифосату. К сожалению, это приводит к гибели определенных видов трав (например, молочая), которые являются основным пищевым ресурсом для таких насекомых, как бабочка-монарх (Pelton et al., 2018). Кроме того, увеличивается количество глифосата в пище человека. Как мы увидим в следующей главе, для нормального развития животных необходима, в частности, здоровая микробиота — популяция микробов в организме и на его поверхности. Микробиота использует те же самые ферменты, которые ингибирует глифосат, и они тоже могут быть уничтожены гербицидом. Таким образом, недавно возникла новая область тератологии, которая связана с дефектами развития, вызванными способностью химических веществ убивать бактерии, являющиеся источниками сигналов нормального развития (Aitbali et al., 2018).

Вещества, нарушающие эндокринную систему: эмбриональные истоки заболеваний

Особая отрасль тератогенеза связана с нарушениями регуляции эндокринной системы в ходе развития. Вещества, нарушающие работу эндокринной системы, представляют собой экзогенные (поступающие извне организма) химические вещества, которые негативно влияют на развитие, нарушая нормальную функцию гормонов (Colborn et al., 1993; 1997). Фенотипические изменения, вызываемые веществами, нарушающими работу эндокринной системы, отличаются от очевидных врожденных анатомических дефектов, обусловленных классическими тератогенами. Напротив, анатомические отклонения, вызываемые блока-

торами эндокринной системы, часто видны только под микроскопом, а в основном это физиологические нарушения. Эффекты веществ, нарушающих работу эндокринной системы, часто становятся заметными только позднее — во взрослом состоянии и могут сохраняться в поколениях после воздействия такого вещества. Недавно обнаружено, что воздействие некоторых эндокринных блокаторов в пренатальном периоде или раннем детстве предупреждает нормальное функционирование мышц конечностей спустя 11 лет (Balalian et al., 2019).



Загадки развития

В северных штатах США в некоторых прудах очень много лягушек с шестью и более конечностями. Что может вызывать такие нарушения?

Вещества, нарушающие эндокринную сферу, могут влиять на функцию гормонов многими путями:

- Они могут имитировать эффект естественных гормонов так, как действует диэтилстильбэстрол (DES), который связывается с рецептором эстрогена и имитирует действие эстрадиола, который участвует в формировании женских половых путей.
- Они могут действовать как антагонисты гормонов и ингибировать их связывание с соответствующим рецептором или блокировать синтез самого гормона. Винклозолин, используемый для предупреждения роста плесени на винограде и ягодах, связывается с рецептором тестостерона и блокирует дифференцировку мужских половых органов и поведенческих реакций (Kelce et al., 1994; Hotchkiss et al., 2003).
- Они могут влиять на синтез, устранение или транспорт гормона в организме. Гербицид атразин, например, усиливает синтез эстрогена и вызывает у лягушек преобразование мужских половых желез в женские.
- Некоторые вещества, нарушающие работу эндокринной системы, могут «минировать» организм, делая его более чувствительным к гормонам на более поздних этапах жизни. Например, воздействие бисфенола А в ходе развития плода делает ткань молочной железы более чувствительной к стероидным гормонам в период беременности.

Долгое время считалось, что тератогенных агентов немного и эти химические вещества вызывают вредное воздействие только в высоких дозах. Теперь, однако, стало ясно, что в современном технологическом обществе вещества, нарушающие работу эндокринной системы, распространены повсюду и воздействие даже малых их доз на плод, развивающийся внутриутробно, может быть достаточным для возникновения значительных медицинских проблем в более позднем возрасте. Среди веществ, нарушающих эндокринную функцию, присутствуют химикаты, содержащиеся в покрытии бутылочек для детского питания и в ярко окрашенных пластиковых

резервуарах для питьевой воды; вещества, используемые в косметике, солнцезащитных кремах и краске для волос, а также составах, предупреждающих воспламеняемость одежды. Когда речь идет о таком большом числе химических веществ, ясно, что мы подвергаемся воздействию не одного, а множества веществ, вредящих одновременно и постоянно эндокринной сфере. Во многих случаях более серьезное повреждение вызывают очень малые (порядка 25 нг/кг веса в день), а не большие дозы (Myers et al., 2009; Belcher et al., 2012; Vandenberg et al., 2012). Это может происходить вследствие того, что высокие концентрации гормона имитируют активацию процессов отрицательной обратной связи (подобно тому, что мы видели в отношении ретиновой кислоты) или химическое вещество в малых дозах связывается с другими рецепторами и, таким образом, активирует другие сигнальные пути (Speroni et al., 2017; Villar-Pazos et al., 2017; Acevedo et al., 2018). Существует множество веществ, нарушающих работу эндокринной системы (Gilbert and Epel, 2015; Kabir et al., 2015). Мы сталкиваемся с ними каждый день и подвергаемся их воздействию еще до рождения.

Диэтилстильбэстрол

Одним из первых среди веществ, нарушающих работу эндокринной системы, был идентифицирован мощный эстроген **диэтилстильбэстрол**, или DES. Считалось, что это лекарство облегчает течение беременности и предупреждает выкидыши, и, согласно оценкам, в период между 1947 и 1971 гг. в США, более 1 млн беременных и их плодов подверглись воздействию DES. Вероятно, это лишь небольшая часть получивших такое воздействие во всем мире. Хотя исследования еще в 1950-х гг. показывали, что на самом деле DES не имеет положительный эффект на течение беременности, его продолжали прописывать до тех пор, пока в 1971 г. он не был запрещен Управлением по надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США. Запрет был наложен, когда у некоторых женщин, чьи матери принимали DES в период беременности, в половых путях были обнаружены злокачественные опухоли специфического типа (светлоклеточная аденокарцинома).

DES воздействует на развитие гонад и половой системы, вызывая изменения в женских половых путях (производных мюллерова протока, образующего верхнюю часть влагалища, шейку матки, матку и яйцеводы; см. рис. 6.7) (**рис. 23.9**). Во многих случаях DES нарушает связь между яйцеводом и маткой (маточно-трубное соединение), что приводит к бесплодию, низкой фертильности и высокому риску возникновения других проблем в репродуктивной сфере (Robboy et al., 1982; Newbold et al., 1983; Hoover et al., 2011).

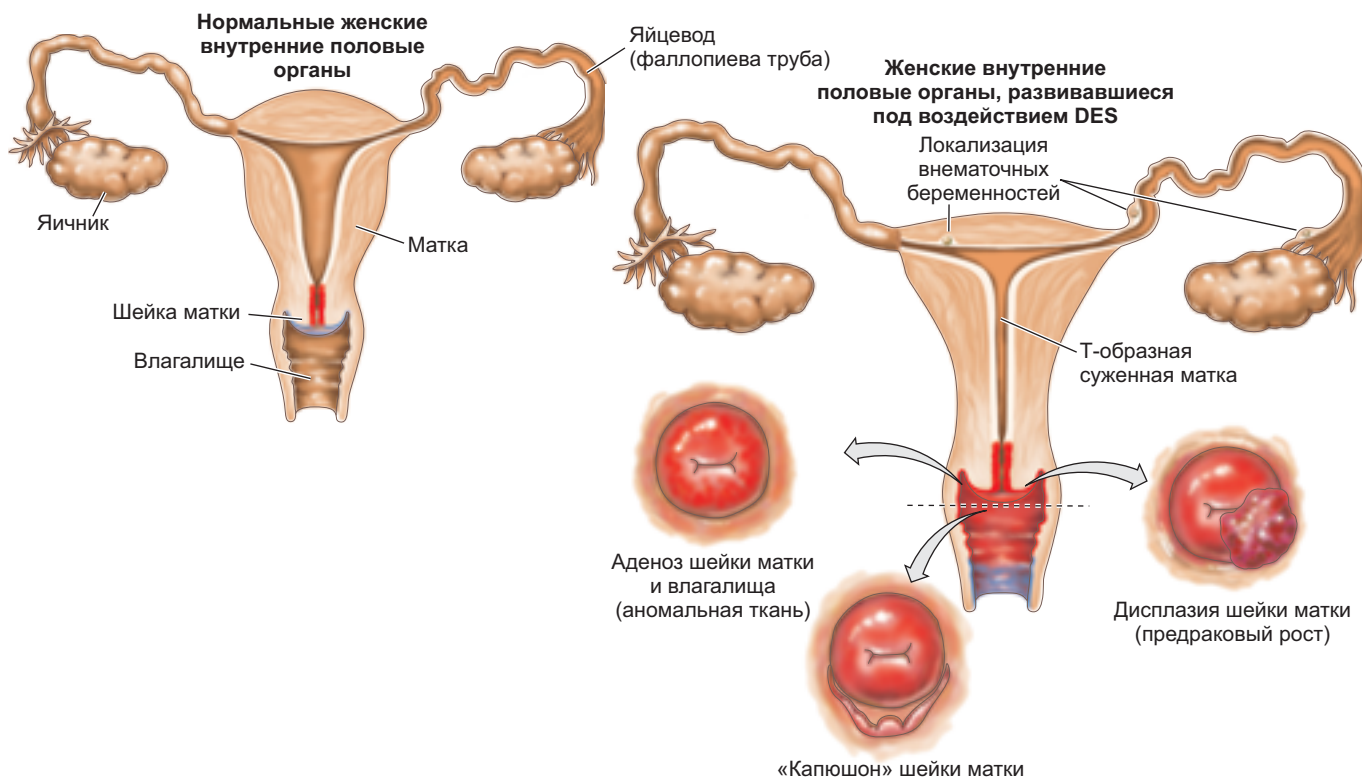
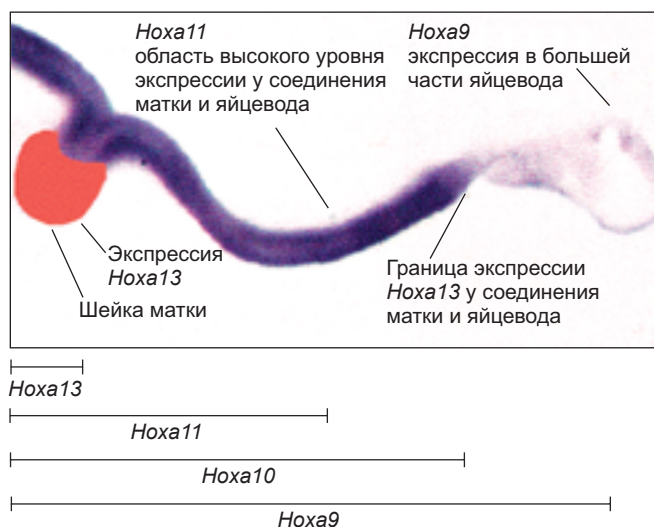


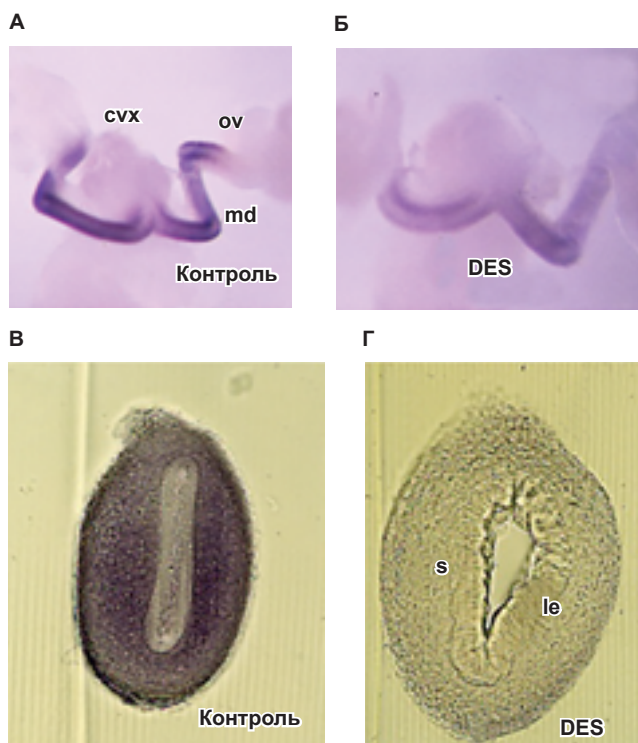
Рис. 23.9. Аномалии генитальных органов могут встречаться у женщин, подвергшихся внутриутробному воздействию DES. У таких «дочерей DES» ткань шейки матки (окрашена красным) часто выступает во влагалище, матка у них может быть суженной и иметь Т-образную форму. Возможны также аденоз шейки матки и влагалища, образование предраковых клеток, внематочная беременность, развитие аденокарциномы и другие эффекты. (Из: S. G. Gilbert and D. Epel, 2009. *Ecological Developmental Biology: Integrating Epigenetics, Medicine and Evolution*. Oxford University Press/Sinauer: Sunderland, MA.)

Симптомы, схожие с синдромом DES человека, наблюдают у мышей, подвергшихся внутриутробному воздействию DES, что позволяет вскрыть механизмы действия этого вещества. В норме участки женских половых путей детерминируют гены *Hoxa*

(рис. 23.10). Эффекты DES на половые пути самок мышей проявляются измененной экспрессией *Hoxa10* в мюллеровом протоке (Ma et al., 1998). Когда DES инъецировали беременным мышам подкожно, он почти полностью подавлял экспрессию *Hoxa10*

Рис. 23.10. Экспрессия гена *Hoxa* в репродуктивной системе нормального 16,5-дневного эмбриона самки мыши. Тотальный препарат гибридизации *in situ* зонда *Hoxa13* (показан красным) вместе с зондом на *Hoxa10* (пурпурный). Экспрессия *Hoxa9* распространена по матке и в большей части презумптивного яйцевода. Экспрессия *Hoxa10* имеет резко очерченный передний край на переходе между презумптивной маткой и яйцеводом. Передний край экспрессии *Hoxa11* такой же, как у *Hoxa10*, но его экспрессия уменьшается ближе к шейке матки. Экспрессия *Hoxa13* обнаружена только в шейке матки и верхней части влагалища. (Из: L. Ma et al., 1998. *Dev Biol* 197: 141–154.)





Все рис. из: L. Ma et al. 1998. *Dev Biol* 197: 141–154

Рис. 23.11. *In situ* гибридизация с зондом *Hoxa10* показывает, что воздействие DES подавляет *Hoxa10*. **А.** Нормальный 16,5-дневный женский эмбрион мыши демонстрирует экспрессию *Hoxa10* от границы шейки матки в примордиальную матку и большую часть яйцевода (cvx — шейка матки; md — мюллеров проток; ov — яичник). **Б.** У мышей, подвергшихся пренатальному воздействию DES, такая экспрессия резко подавлена. **В.** У контрольной самки мыши на 5-й день после рождения (когда репродуктивные ткани еще продолжают формироваться) срез через матку показывает значительную экспрессию *Hoxa10* в мезенхиме матки. **Г.** У самки мыши, которая получала большие дозы DES через 5 дней после рождения, экспрессия *Hoxa10* в мезенхиме почти полностью подавлена (le — выстилающий эпителий; s — строма). (Все рис. из: L. Ma et al., 1998. *Dev Biol* 197: 141–154.)

в мюллеровом протоке развивающихся зародышей (рис. 23.11). Такое подавление было наиболее выражено в строме (мезенхиме) протока, с которой экспериментальные эмбриологи связывают эффект DES (Boutin and Cunha, 1997). Кроме того, у мышей, нокаутных по гену *Hoxa10* (Benson et al., 1996; Ma et al., 1998), часть матки трансформируется в ткань яйцеводов и возникают аномалии трубно-маточного соединения.

Белки Wnt обеспечивают связь между экспрессией гена Нох и морфологией матки. Белки Нох и Wnt вовлечены в детерминацию и морфогенез репродуктивных тканей (рис. 23.12). Половые пути самок мышей, подвергшихся воздействию DES, напоминают таковые у мышей, нокаутных по *Wnt7a*. Гены

Нох и гены Wnt взаимно поддерживают активность друг друга, однако DES, действующий через рецептор эстрогена, репрессирует ген *Wnt7a*. Это нарушает поддержание экспрессии гена Нох и предупреждает активацию другого гена Wnt (*Wnt5a*), кодирующего белок, необходимый для пролиферации клеток (Miller et al., 1998; Carta and Sassoon, 2004).

Влияние DES на детородную функцию — это оставшийся в прошлом инцидент, в котором задействованы и государственная политика, и медицина, и биология развития (Bell, 1986; Palmlund, 1996), а проблема эндокринных нарушений, вызываемых другими эстрогенными соединениями, остается актуальной. В соглашении Чэпел-Хилл (The Chapel Hill Consensus) от 2007 г. указано, что некоторые из основных компонентов пластмасс являются эстрогенными соединениями и что они представлены в дозах, достаточно больших, чтобы иметь выраженный эффект на половое развитие человека (vom Saal et al., 2007). Наиболее важен из этих соединений бисфенол А.

Бисфенол А

Во времена начала эндокринологических исследований стероидные гормоны было очень трудно выделять, и поэтому химики разработали их синтетические аналоги, которые должны были выполнять те же функции. Один из таких аналогов, бисфенол А (ВРА), был впервые синтезирован как эстрогенное соединение в 1930 г. Позднее специалисты по полимерам поняли, что ВРА можно использовать в производстве пластмасс, и ныне это одно из 50 наиболее производимых в мире химических веществ. Ежегодно четыре корпорации в США поставляют почти 1 млрд фунтов этого вещества в качестве полимерного покрытия пластиковых емкостей, в том числе поликарбонатных бутылочек для детского питания, детских игрушек и бутылок для воды. Он также используется в зубных пломбировочных материалах и, как это ни странно, в кассовых чеках. В модифицированной форме тетрабромбисфенола А — это основной анти-воспалитель ткани.

Воздействие ВРА на человека в первую очередь связано с веществом, выделяющимся из пищевых контейнеров (von Goetz et al., 2010). К новорожденным и детям ВРА поступают из поликарбонатных бутылочек; подростки и взрослые основную часть ВРА получают с едой, продаваемой в контейнерах, покрытых полимером, содержащим ВРА. Поскольку 95% анализов мочи, взятых у жителей США и Японии, имеют измеримый уровень ВРА (Calafat et al., 2005) и поскольку ВРА может тормозить развитие мозга приматов в концентрациях более низких, чем те, которые считаются безопасными согласно постановлениям Агентства по охране окружающей среды США (Lernath et al., 2008), по поводу роли

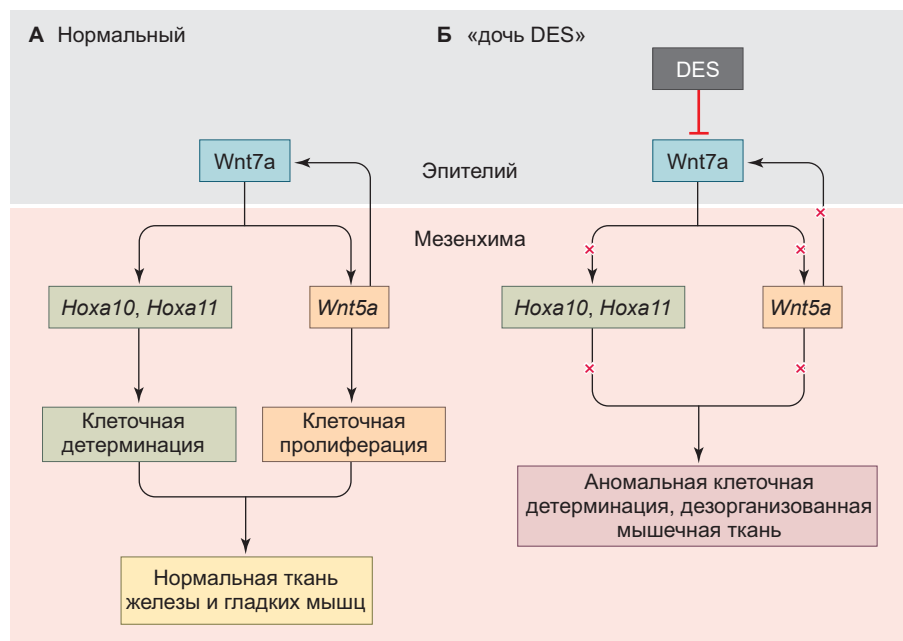


Рис. 23.12. Нарушение морфогенеза мюллерова протока под действием DES. **А.** В ходе нормального морфогенеза гены *Hoxa10* и *Hoxa11* в мезенхиме активирует и поддерживает Wnt7a, поступающий из эпителия. Wnt7a, кроме того, индуцирует в мезенхиме *Wnt5a*, а белок Wnt5a и поддерживает экспрессию Wnt7a, и вызывает пролиферацию мезенхимных клеток. Вместе эти факторы детерминируют и регулируют морфогенез матки. **Б.** DES через рецептор эстрогена блокирует экспрессию Wnt7a. Нормальная активация генов *Hox* и *Wnt5a* в мезенхиме не происходит, что ведет к радикальному изменению морфологии женских гениталий. (По данным: J. Kitajewsky and D. Sassoon, 2000. *BioEssays* 22: 902–910.)

БРА в формировании патологий репродуктивной сферы, онкологических заболеваний и психических расстройств возник ряд опасений.

БРА И ЗДОРОВЬЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СФЕРЫ

БРА не остается связанным с пластиком навек (Krishnan et al., 1993; vom Saal, 2000; Howdeshell et al., 2003). Если при комнатной температуре залить воду в старый поликарбонатный бокс для лабораторных крыс, то через неделю вы увидите, что в ней окажется около 300 мкг БРА на литр. Это биологически активное количество, которое способно вызвать реверсию пола у самцов лягушек и изменение веса матки у молодых мышей. Такой «вымывающийся» БРА может вызывать и хромосомные нарушения. Если лаборант по ошибке сполоснет поликарбонатную крысиную клетку щелочным детергентом, у самок мышей, помещенных в нее, аномалии мейоза будут встречаться в 40% ооцитов, тогда как нормальный уровень таких аномалий составляет всего около 1,5%). Показано, что когда БРА вводили беременным крысам в контролируемых условиях, то кратковременного воздействия малой дозы БРА оказалось достаточно, чтобы вызвать дефекты мейоза в созревающих ооцитах мыши (Hunt et al., 2003). Такой же эффект наблюдали и на приматах. Воз-

действие малых доз БРА (на уровне, сравнимом с обнаруживаемым в сыворотке человека) на беременных самок обезьян вызывало аномалии яйцеклеток и мейотических делений, схожие с наблюдавшимися на мышах. Были обнаружены и некоторые аномалии ооцитов, например нарушение поведения хромосом в мейозе и формирование дефектных фолликулов (Hunt et al., 2012).

БРА проникает через плаценту человека и аккумулируется в концентрациях, которые могут нарушить развитие лабораторных животных (Ikezuki et al., 2002; Schönfelder et al., 2002). Действительно, у женщин, получивших во время беременности большие дозы БРА, было на 83% больше выкидышей, чем у женщин, которые не имели такого жесткого воздействия (Lathi et al., 2014). На модельных организмах в экологически обоснованных концентрациях БРА может вызывать аномалии гонад плода, увеличение простаты, малое количество сперматозоидов и поведенческие отклонения, которые проявляются потом у взрослых (vom Saal et al., 1998; Palanza et al., 2002; Kubo et al., 2003; vom Saal and Hughes, 2005). Если беременным мышам в течение 7 дней в конце беременности (в период, эквивалентный тому, когда у человека происходит развитие половых органов) давать 2 части на миллиард (ppb) БРА (vom Saal et al., 1997), т. е. 2 нг/г веса тела, у мужского потомства происходит увеличение размера простаты

приблизительно на 30% (Wetherill et al., 2002; Timms et al., 2005). В органной культуре ткани семенников человека ВРА нарушал развитие спермы и продукцию тестостерона (Eladak et al., 2018).

Самки мышей, на которых внутриутробно действовали очень низкие дозы ВРА (например, 25 нг/кг веса в день), вскоре после рождения проявляли пониженную фертильность и плодовитость во взрослом состоянии (Cabaton et al., 2011). Пониженная фертильность была результатом действия нескольких факторов, помимо упомянутых выше эффектов на развивающиеся яйцеклетки. Во-первых, показано, что ВРА и другие агенты, повреждающие эндокринную систему, предупреждают созревание тех частей мозга мыши, которые регулируют овуляцию (Rubin and de Sauvage, 2006; Gore et al., 2011). Во-вторых, у самок мышей, внутриутробно подвергшихся воздействию малых доз ВРА (в 2000 раз более низких, чем дозы, считающиеся безопасными), имелись отклонения в строении матки, влагалища, молочных желез и яичников, а у взрослых, кроме того, нарушения эстрального цикла (Howdeshell and vom Saal, 2000; Markey et al., 2003; Acevedo et al., 2018). В-третьих, самки мышей, подвергшиеся краткому воздействию «безопасного» уровня ВРА, имели дефекты плаценты, приводившие к ухудшенному росту плодов (Müller et al., 2018). И в-четвертых, было обнаружено, что ВРА изменяет паттерн гаметоспецифичного метилирования импринтинговых генов эмбрионов и плацент мышей (Susiarjo et al., 2013).

Устранение ВРА из окружающей среды очень важно, но трудно выполнимо. Даже BPS и BPF — аналоги ВРА, предлагаемые химической промышленностью в качестве «безопасной» альтернативы, как было показано, нарушают эндокринную систему, проявляя эстрогенные эффекты (Rochester and Bolden, 2015; Le Fol et al., 2017).

Атразин: эндокринные нарушения, вызываемые нарушением синтеза гормона

Фермент ароматаза может преобразовать тестостерон в эстроген, который способен индуцировать формирование того или иного пола у многих позвоночных. Например, у черепах эстроген подавляет гены, формирующие семенники, и усиливает функцию генов, формирующих яичники (Valenzuela et al., 2013; Bieser and Wibbels, 2014). ВРА и другие эстрогенные вещества, нарушающие эндокринную систему, могут также вызывать реверсию пола у черепах, развивающихся при температурах, стимулирующих формирование самцов (Jandegian et al., 2015). Это и другие исследования (Bergeron et al., 1994, 1999) имеют важное значение с точки зрения мер по сохранению видов, существованию которых угрожает опасность

(в том числе черепах, земноводных и крокодилов) и у которых гормоны могут играть роль в первичном детерминировании пола.

Выживание некоторых видов земноводных находится под угрозой вследствие присутствия гербицидов, которые могут запускать продукцию эстрогенов вместо тестостерона, что значительно уменьшает число, функциональность и фертильность самцов. Один из таких случаев — это развитие гермафродитных и демаскулинизированных лягушек после воздействия крайне низких доз одного из наиболее распространенных в мире гербицидов — атразина, обнаруживаемого в речках и прудах по всем Соединенным Штатам (рис. 23.13). Атразин стимулирует превращение тестостерона упоминавшейся выше ароматазой в эстроген. Хэйес с сотрудниками (Hayes et al., 2002a) обнаружили, что воздействие на головастики атразина в таких низких концентрациях, как 0,1 ppb (10^{-9}), приводит к аномалиям гонад и другим нарушениям в половой сфере у самцов лягушек. При действующих концентрациях 0,1 ppb и выше у многих головастиков мужского пола помимо семенников развиваются и яичники. При действии 1 ppb атразина резонаторы (необходимые самцам для звуковой сигнализации в поиске полового партнера) не могут нормально развиваться. Похожие эксперименты в полевых условиях, более совпадающих с естественными (Langlois et al., 2010), показали, что самцы леопардовой лягушки (*Rana pipiens*) трансформировались при действии атразина в самок.

В лабораторных экспериментах уровень тестостерона у взрослых самцов лягушек уменьшался на 90% (до уровня контрольных самок), когда на них действовали атразином в концентрации 25 ppb (Hayes et al., 2002a). Это экологически обоснованная доза, поскольку разрешенное в США количество атразина в питьевой воде составляет 3 ppb, а уровень атразина в реках Среднего Запада США может достигать 224 ppb (Battaglin et al., 2000; Barbash et al., 2001). Даже при действии таких малых доз, как 2,5 ppb, половое поведение самцов лягушек резко подавлено. Спаривания становятся сравнительно редкими, а в 10% случаев самцы под действием атразина становятся откладывающими яйца самками (Hayes et al., 2010).

В полевых исследованиях Хэйес с сотрудниками собирали леопардовых лягушек и образцы воды из восьми локаций в центральной части США (Hayes et al., 2002b; 2003). Они отправляли образцы воды для определения уровня атразина в две разных лаборатории, а также кодировали образцы лягушек так, чтобы лаборанты, выделяющие из них гонады, не знали, в каком месте эти животные пойманы. Результаты показывают, что вода из всех, кроме одной, локаций содержит атразин, и именно в этом единственном месте у лягушек не было аномалий гонад. Даже при действии такой низкой концентрации атразина, как 0,1 ppb, у леопардовой лягушки возникали

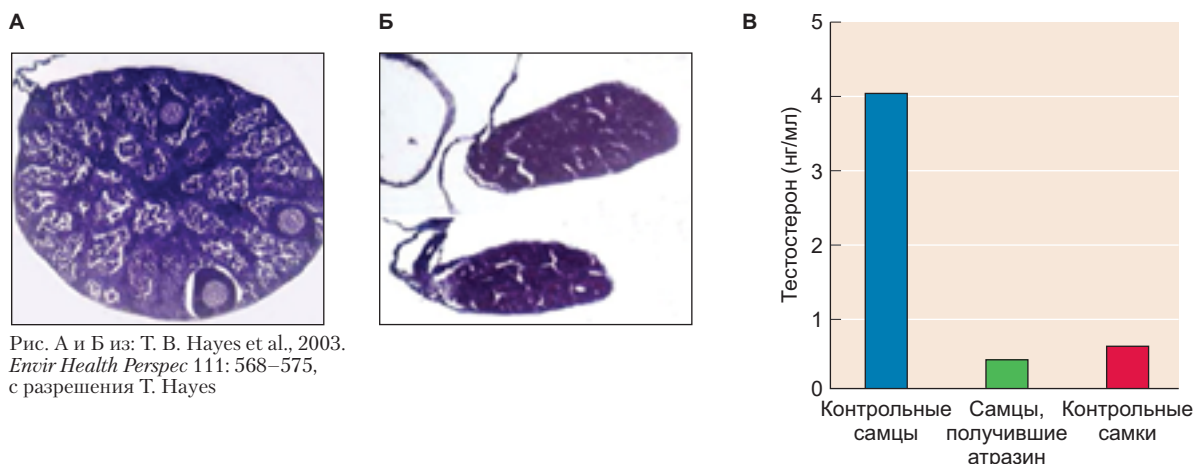


Рис. А и Б из: Т. В. Hayes et al., 2003. *Envir Health Perspec* 111: 568–575, с разрешения Т. Hayes

Рис. 23.13. Демаскулинизация лягушек под действием малых количеств атразина. **А.** Семенник лягушки *in situ* при воздействии 0,5 частей на миллиард (ppb) атразина. Семенник содержит три дольки, в которых развиваются как сперма, так и ооциты. **Б.** Два семенника лягушки *in situ*, содержащие 0,8 ppb атразина. Эти органы демонстрируют резкое нарушение развития семенников, которое характерно для 28% лягушек, обнаруженных в данной локации. **В.** Эффект 46-дневного воздействия 25 ppb атразина на уровень тестостерона в плазме крови половозрелого самца шпорцевой лягушки *Xenopus*. В контроле самцы имеют в 10 раз более высокий уровень, чем у контрольных самок; получавшие атразин самцы имеют уровень тестостерона такой же или ниже, чем у контрольных самок. (Рис. В по данным: Т. В. Hayes et al., 2002. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5476–5480. © 2002 National Academy of Sciences, U. S. A.)

нарушения развития семенников (задержанный рост семенников) или их конверсия в яичники. Во многих отработанных образцах ооциты обнаруживали в семенниках (рис. 23.13).

Способность атразина феминизировать мужские гонады можно наблюдать во всех классах позвоночных. Действительно, малое количество спермы, низкое ее качество и пониженная фертильность обнаружены и у людей, которые постоянно контактируют с атразином (Swan et al., 2003; Hayes et al., 2011). Обеспокоенность очевидной способностью атразина разрушать половые гормоны и в дикой природе, и у человека привела к запрету использования этого гербицида во Франции, Германии, Италии, Норвегии, Швеции и Швейцарии (Dalton, 2002). Однако компании, производящие его в США, успешно лоббируют сохранение атразина на американских рынках (Blumenstyk, 2003; Aviv, 2014).

Гидравлический разрыв пласта: новый потенциальный источник веществ, нарушающих эндокринную сферу

В нормативных актах правительства США не учтены соединения, вносимые в окружающую среду в ходе гидравлического разрыва пласта (фрэкинга), используемого для экстракции метана (природного газа)

из сланцев. Всего в таком процессе задействовано 632 химических вещества, и около 25% из них вызывают злокачественные опухоли, а более 35% влияют на эндокринную систему (Colborn et al., 2011). Согласно расчетам, около 50% жидкости, используемой для фрэкинга, возвращается на поверхность земли (Department of Energy, 2009). Образцы воды, взятые из непроточных водоемов и из почвенных вод на местах фрэкинга, содержали эстрогенные соединения, антиэстрогенные и антиандрогенные соединения (антагонисты тестостерона) (Kassotis et al., 2014; Webb et al., 2014). Некоторые из этих содержащихся в воде веществ активировали энхансеры генов, реагирующих на эстрогены, а другие предупреждали активацию генов, реагирующих на тестостерон.

Пrenатальное воздействие очищенной смеси химических веществ, обнаруживаемых в воде, используемой в процессе фрэкинга (в концентрациях, присутствующих в питьевой воде вблизи от места добычи газа), вызывало нарушения в репродуктивной сфере у самок мышей и отклонения уровня гормонов гипофиза у мышей обоих полов (Kassotis et al., 2015, 2016). В одном из мест, где тестировали воду, на животноводческой ферме, работу, однако, пришлось прекратить, поскольку животные перестали там приносить приплод. Недавние исследования фрэкинга в сельской местности в штате Колорадо подтвердили увеличение числа врожденных заболеваний сердца у детей в семьях, проживающих вблизи от скважин

фрэкинга (McKenzie et al., 2014). Таким образом, фрэкинг, вероятно, является источником химических веществ, которые ухудшают фертильность и развитие мозга, а метан участвует в образовании парниковых газов, ускоряющих глобальное потепление.

Наследование нарушений развития

Даже если вы всю жизнь будете рубить дрова, это несколько не накачает бицепсы ваших потомков, точно так же, если в результате несчастного случая вам оторвет руки, ваши дети не родятся безрукими. Это потому, что факторы среды — тренировка или травма — не вызывают мутаций в ДНК. Чтобы передаваться из поколения в поколение, мутации должны не только быть соматическими, но и появиться в генеративных клетках. Так, генетические мутации в клетках кожи, подверженной избыточной инсоляции, не унаследуются. Однако одним из наиболее удивительных результатов современной генетики развития является открытие, что определенные фенотипы, индуцированные факторами внешней среды, *могут передаваться* из поколения в поколение. Метилирование ДНК может быть механизмом, который позволит обойти мутационный барьер передачи приобретенных признаков (см. гл. 3).

Определенные агенты вызывают такие же нарушения метилирования ДНК во всем организме, как мутации, и эти изменения метилирования могут передаваться спермиями и яйцеклетками. Зафиксированы десятки случаев, в которых различные эпиаλληли — ДНК, содержащие разные паттерны метилирования, — могут стабильно передаваться из поколения в поколение (Jablonka and Raz, 2009). У млекопитающих эпиаλληльная наследственность впервые была зафиксирована в исследованиях нарушающего работу эндокринной системы винклозолина — фунгицида, широко используемого для защиты виноградной лозы. При инъекции беременным крысам в определенные дни вынашивания винклозолин вызывал нарушения развития семенников у потомства мужского пола. Семенники начинали формироваться нормально, однако потом, когда мыши становились старше, дегенерировали и переставали производить сперму. Интереснее то, что мужское потомство самцов мышей с индуцированными нарушениями развития семенников (часто вызванными искусственными средствами) также имело нарушения в развитии семенников. То же происходило и с их потомством мужского пола, и потомством в последующих поколениях (Anway et al., 2005; Anway and Skinner, 2006; Guerrero-Bosagna et al., 2010). Таким образом, если беременная крыса получала винклозолин, страдали даже ее правнуки (рис. 23.14).

Очевидно, что механизм такого наследования у крыс состоит в метилировании ДНК (Skinner, 2016). Под действием винклозолина меняется паттерн метилирования промоторов более чем 100 генов в клетках Сертоли (см. гл. 6), и такие отклонения в метилировании обнаружены в ДНК сперматозоидов, по крайней мере, у трех последующих поколений (Guerrero-Bosagna et al., 2010; Stouder and Paolini-Giacobino, 2010). В число этих генов входят и те, которые необходимы для клеточной пролиферации, функционирования G-белков, ионных каналов и рецепторов. Важно отметить, что третье (F_3) поколение могло совсем не иметь прямого контакта с винклозолином. Первый плод находился в утробе матери, а его герментативные клетки (F_2 поколения) — внутри его. Но даже хотя потомство поколений F_3 и F_4 никогда не соприкасалось с винклозолином, их фенотип изменен первичной инъекцией, сделанной их прабабушке.

Исследования показывают, что другие вещества, нарушающие эндокринную сферу (DES, бисфенол А и многохлористые бифенолы (PCB)), тоже имеют эффекты в последующих поколениях (Skinner et al., 2010; Walker and Gore, 2011; Gillette et al., 2018). Действительно, поведенческие изменения, индуцированные ВРА у мышей, могут длиться, по меньшей мере, четыре поколения, а различия в метилировании ДНК обнаружены в мозге мышей в нескольких поколениях после того, как беременной самке давали ВРА (Wolstenhome et al., 2012; Drobná et al., 2018). Медицинские аспекты такого наследования ныне только начинают изучать.

Рак как заболевание, связанное с развитием

Помимо тератогенеза и эндокринных нарушений, заболеванием, связанным с аномалиями развития, признают образование злокачественных опухолей (Virchow, 1858; Stevens and Little, 1953; Auerbach, 1961; Pierce et al., 1978). Заголовок в уважаемой газете «Нью-Йорк Таймс» четко сформулировал связь между раковыми опухолями и эмбриогенезом: «Рак — отвратительный близнец эмбриона». **Канцерогенез** (формирование злокачественных опухолей) — это нечто большее, чем просто генетическое изменение в клетках, порождающее опухоль (Hanahan and Weinberg, 2000; Versteeg, 2014; Jamshidi et al., 2017). В какой-то степени раковую опухоль можно рассматривать как болезнь межклеточных взаимодействий, когда в раковых клетках начинают происходить многие процессы, характерные для эмбриональных клеток. Когда такие процессы возобновляются, отключаются механизмы, ограничивающие во взрослых клетках деление, миграцию, прикрепление к другой тка-

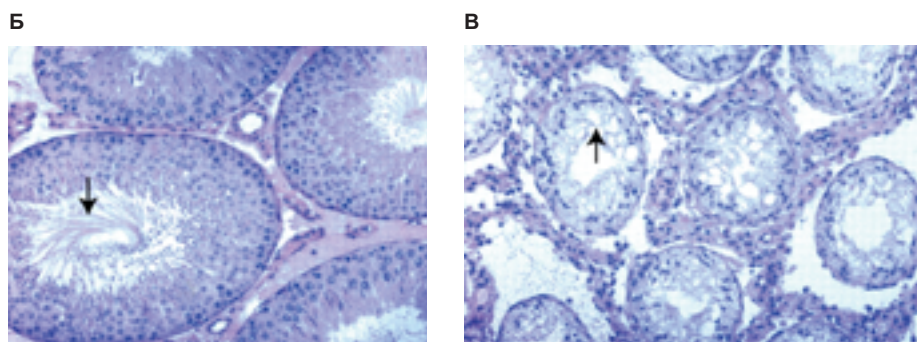
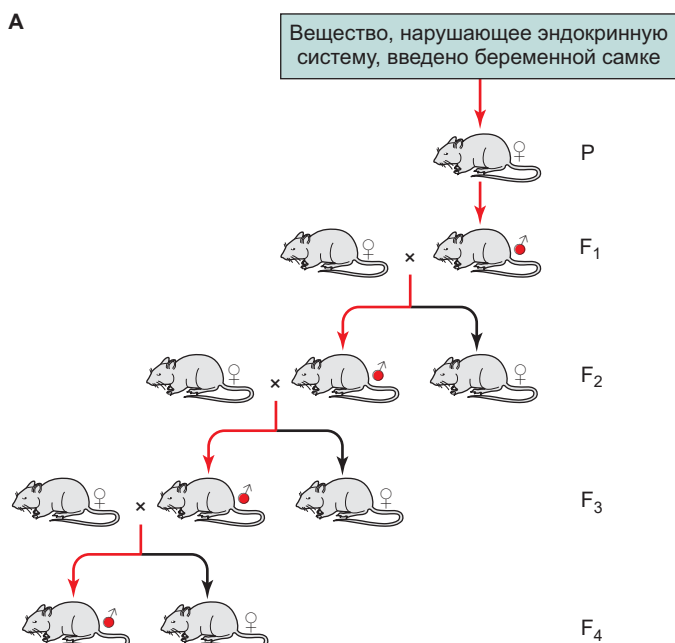


Рис. Б и В из: M. D. Anway et al., 2005. *Science* 308: 1466–1469, с разрешения M. K. Skinner

Рис. 23.14. Эпигенетическое наследование эндокринного нарушения. **А.** Наследование синдрома нарушения развития семенников (красные кружки) показано в четырех поколениях мышей. Единственная мышь, подвергшаяся воздействию внутриутробно — поколение F₁. **Б, В.** Срез семенных канальцев из семенников контрольного самца крысы (Б) и (В) самца крысы, чей дед родился от матери, получившей инъекцию винклозолина. Стрелкой на (Б) показаны хвосты нормальных сперматозоидов. Стрелкой на (В) показано отсутствие сперматозоидов в значительно уменьшенном канальце самца крысы, происходящего от самки, инъецированной винклозолином; этот самец был при обычных условиях бесплоден. (Рис. А по данным: M. D. Anway and M. K. Skinner 2006. *Endocrinology* 147: S43–S49)

ни, имплантацию в ткань и формирование новых кровеносных сосудов в новообразованной ткани. Действительно, формирование и миграцию раковых клеток недавно сравнили с развитием и имплантацией бластоцисты в матку (Mor et al., 2017; Vento-Tormo et al., 2018).

В свое время полагали, что канцерогенез и формирование метастазов могут происходить вследствие лишь пролиферации мутировавших клеток, которые в результате стали «автономными». Эта **теория соматических мутаций** характеризовала опухоль ее внутриклеточными механизмами, которые дают возможность клеткам стать независимыми от их окружения. Считалось, что злокачественные опухоли вызывает пролиферация «клеток-предателей». Оказалось, однако, что это лишь часть объяснения проблемы. В конце XX в. биологи вернулись к старой идее, что рак — это нарушение взаимодействия между тканями. Такой альтернативный взгляд назвали **теорией тканевой реорганизации** или **теорией морфогенетических полей** (tissue organization field theory, TOFT), которая рассматривает раковую опухоль как «аномальное развитие» (Sonnenschein and Soto, 1999; 2016).

Согласно этой теории, канцерогенез нарушает реципрокную коммуникацию между мезенхимной и эпителиальной тканями органа. Мутации — один из путей, приводящих к такому результату, но не главный. Более того, TOFT принимает как исходную предпосылку то, что пролиферация и подвижность — это имманентные свойства клеток. Нормальные клетки делятся и двигаются, статика достигается межклеточными взаимодействиями. Когда реципрокные взаимодействия нарушаются, ограничения, накладываемые на клетки тканью в пределах поля ее влияния, ослабляются. В результате клетки начинают бесконтрольно проявлять свои потенции к пролиферации и подвижности, формируя, таким образом, опухоли, вторгаясь в ткани и продвигаясь в отдаленные места организма, где образуют метастазы.

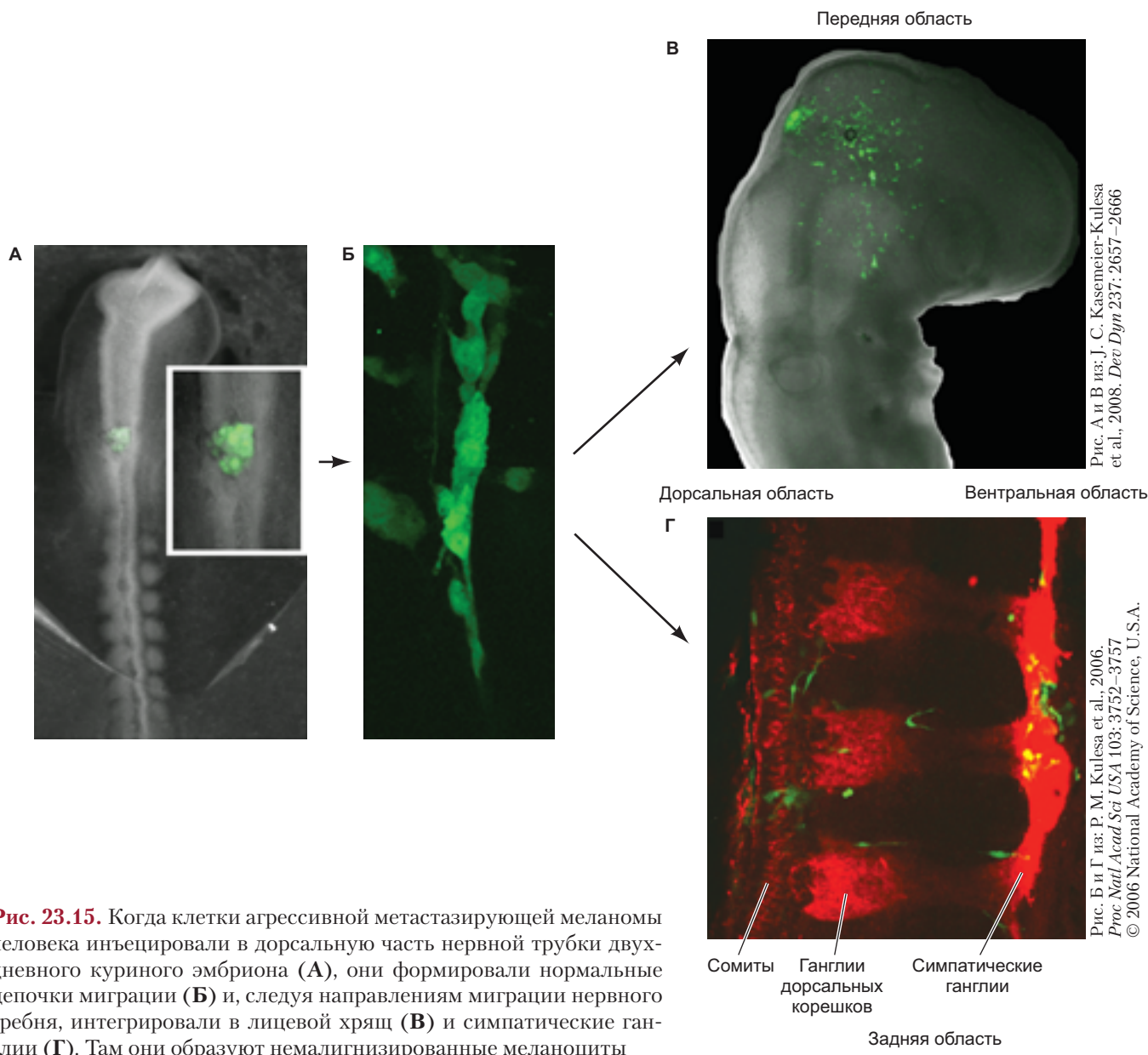
Канцерогенез представляет собой поэтапное развитие состояния, зависящее от реципрокных взаимодействий между зарождающимися раковыми клетками и окружающими их клетками ткани. Прогрессивное изменение межклеточных взаимодействий приводит к формированию аномальной архитектуры ткани и, возможно, образованию ниши, в которой

генерируются опухолевые клетки. На самом деле процесс формирования таких клеток выглядит, как повторение стадий нормального развития, включая формирование ниши, в которой происходит пролиферация. Таким образом, и онкологические заболевания, и врожденные аномалии можно рассматривать как болезни организации тканей, дифференцировки и межклеточных взаимодействий. Как мы увидим далее, они часто возникают вследствие сбоев в одних и тех же сигнальных путях. Существует множество причин описывать малигнизацию и метастазирование в терминах развития, три из которых следующие:

- 1) контекст-зависимое формирование злокачественных опухолей;
- 2) дефекты межклеточных взаимодействий как триггер процесса малигнизации;
- 3) раковые стволовые клетки.

КОНТЕКСТ-ЗАВИСИМЫЕ ОПУХОЛИ

Многие опухолевые клетки имеют нормальный геном и как в доброкачественных, так и злокачественных (мигрирующих и инвазивных) опухолях зависят от своего окружения (Pierce et al., 1974; Mack et al., 2014). Наиболее примечательны среди таких форм **тератокарциномы** — опухоли, состоящие из зародышевых или стволовых клеток (Illmensee and Mintz, 1976; Stewart and Mintz, 1981). Тератокарциномы представляют собой результат злокачественного роста клеток, напоминающих внутреннюю клеточную массу бластоцисты млекопитающего, который и убивает организм. Однако, если клетки тератокарциномы поместить во внутреннюю клеточную массу бластоцисты мыши, они интегрируются в бластоцисту, утратят злокачественность и будут делиться



нормально. Потомки этих клеток могут стать частью многих органов эмбриона, и если они войдут в зародышевую линию, то спермии или яйцеклетки, сформировавшиеся из опухолевых клеток, передадут опухолевый геном следующему поколению. Таким образом, станет клетка опухолевой или частью эмбриона, может зависеть от окружающих клеток.

Возможно, что окружение стволовой клетки подавляет формирование опухоли путем секреции ингибиторов паракринных сигнальных путей. Например, многие клетки опухолей, таких как меланома, секретируют паракринный фактор Nodal, который облегчает ее пролиферацию и обеспечивает снабжение кровеносными сосудами. Когда агрессивную меланому (которая происходит из клеток нервного гребня) помещают в окружение эмбриональных ство-

ловых клеток (секретирующих ингибиторы Nodal), она превращается в нормальные пигментные клетки (Hendrix et al., 2007; Postovit et al., 2008). Замечательно, что такие злокачественные клетки меланомы, будучи трансплантированы в ранний куриный эмбрион, подавляют экспрессию Nodal и мигрируют как нормальные клетки вдоль пути клеток нервного гребня (рис. 23.15; Kasemeier-Kulesa et al., 2008).

НАРУШЕНИЯ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

В соответствии с теорией морфогенетических полей (TOFT) тканевые взаимодействия необходимы для предупреждения деления клеток, а это позволяет предположить, что злокачественный рост может быть

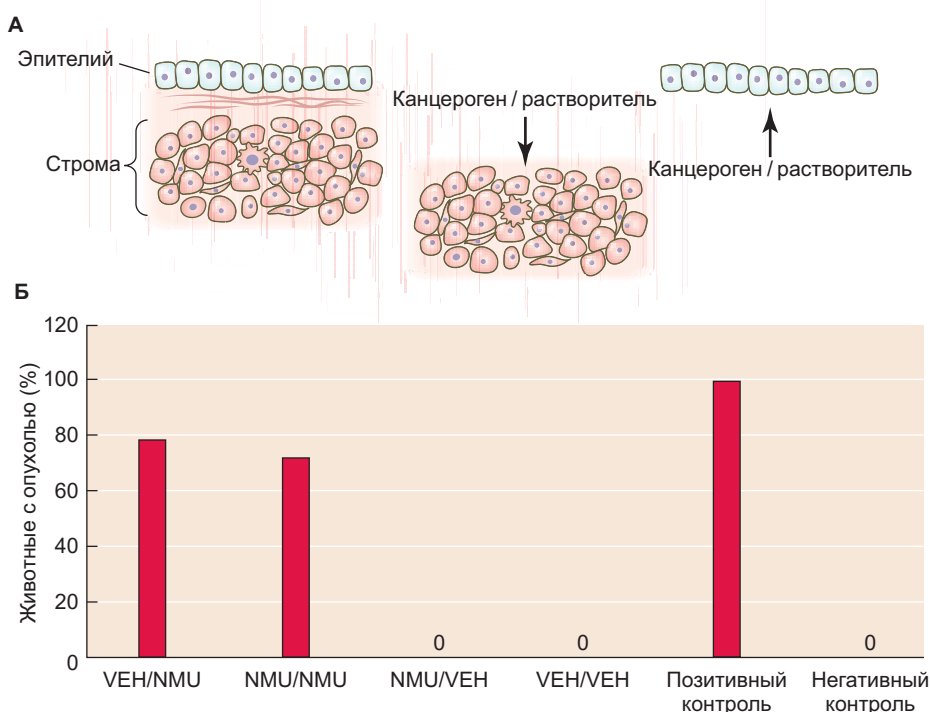


Рис. 23.16. Доказательство того, что строма регулирует возникновение эпителиальных (паренхиматозных) опухолей. **А.** Схема экспериментального протокола. Ткань молочных желез содержит и эпителий, и строму (мезенхимные клетки). Две группы клеток могут быть изолированы и затем рекомбинированы. Вещество, вызывающее опухолевый рост (канцероген), может быть добавлено в эпителий, но не в строму или в строму, но не в эпителий. Затем строма и эпителий могут быть скомбинированы так, что канцероген воздействовал только на эпителий (но не на строму), на строму (но не на эпителий), и на то и на другое, либо ни на то ни на другое. **Б.** Результаты эксперимента, когда канцерогенный мутаген N-нитрозометилмочевина (NMU) или контрольный растворитель (VEN) добавляли либо в строму, либо в эпителий и клетки трансплантировали обратно в молочную железу крысы. По горизонтальной оси обозначение слева от дробки показывает воздействие, оказанное на эпителий, а обозначения справа от дробки — оказанное на строму. Только у животных, на чью строму воздействовали NMU, развивались опухоли, независимо от того, воздействовали NMU на эпителий или нет. У интактных животных, получивших воздействие NMU (позитивный контроль), развивались опухоли, а ни у одной из крыс, получивших контрольные растворы (негативный контроль), не развивались. (Рис. Б по данным: M. V. Maffini et al., 2004. *J Cell Sci* 117: 1495–1502.)

вызван нарушением взаимодействия между клетками. Таким образом, опухоль может возникать в результате нарушений архитектуры ткани, и окружение клетки критично в определении ее злокачественности (Sonnenschein and Soto, 1999; 2000; Bissell et al., 2002). Исследования показали, что опухоли могут быть вызваны изменениями структуры ткани и что рост таких опухолей можно подавить восстановлением нормального тканевого окружения (Coleman et al., 1997; Weaver et al., 1997; Booth et al., 2011). В частности, хотя 80% опухолей у человека возникает из эпителиальных клеток, они не всегда являются местом повреждения, вызвавшего опухолевый рост. Напротив, злокачественные образования, происходящие из эпителиальных клеток, часто вызваны нарушениями в мезенхимных стромальных клетках, которые окружают и поддерживают эпителий. Когда рекомбинировали нормальный и обработанный канцерогеном эпителий и мезенхиму в молочных железах крысы, опухолевый рост эпителиальных клеток молочной железы наблюдали не в обработанном канцерогеном эпителии, а только в эпителии в комбинации с мезенхимой молочной железы, которую подвергали действию канцерогена (Maffini

et al., 2004). Таким образом, канцероген вызывал дефекты мезенхимной стромы молочной железы, которая уже была не в состоянии обеспечить эпителиальные клетки — ограничители деления и подвижности (рис. 23.16). Эти факты привели к новому пониманию путей, которыми стромальные клетки могут регулировать инициацию злокачественного роста в соседнем эпителии (Wagner, 2016).

Таким образом, опухоль может возникать в результате нарушения паракринной сигнализации между клетками. Согласно заключению авторов одного из исследований, несколько ключевых сигнальных путей, таких как Hedgehog, Notch, Wnt и BMP/TGF β /активин, вовлечены в большинство процессов, существенных для нормального развития эмбриона (Rubin and de Sauvage 2006). Также становится все более ясно, что эти пути могут играть критически важную роль в онкогенезе, когда они активируются во взрослых тканях спорадическими мутациями или другими механизмами. Мы уже видели это выше в обсуждении секреции Nodal клетками меланомы. Эти данные показывают важность только что упомянутой стромальной ткани. Многие опухоли, например, секретируют паракринный фактор

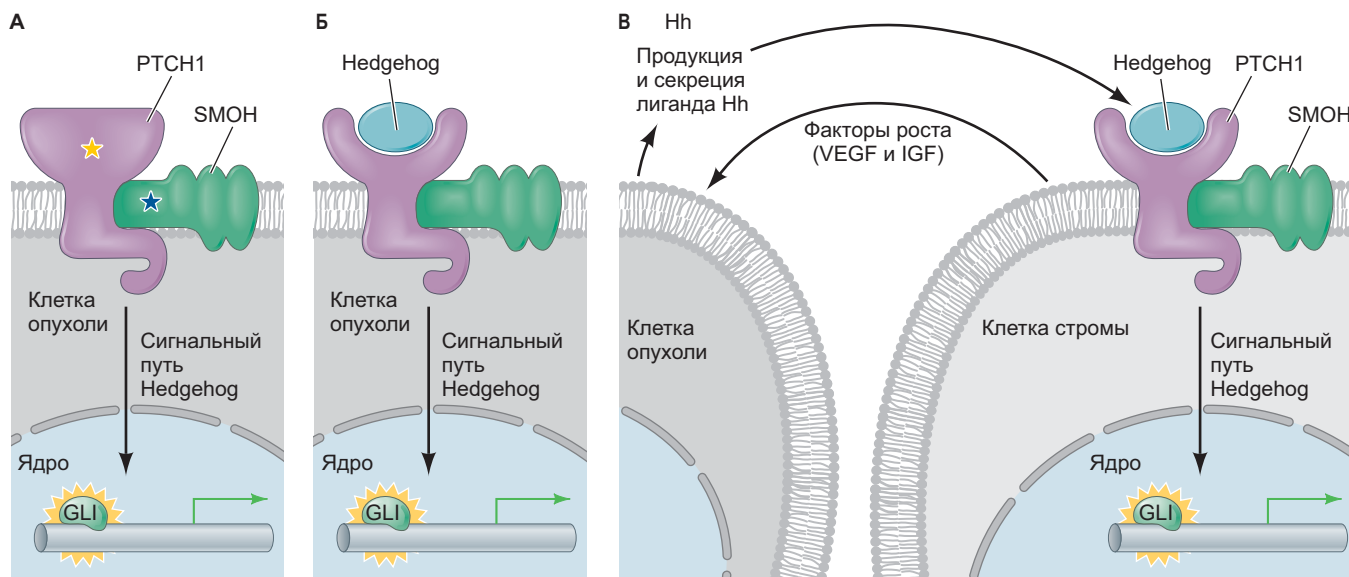


Рис. 23.17. Механизмы, которыми сигнальный путь Hedgehog (Hh) (см. рис. 4.24) может вызывать развитие раковой опухоли. **А.** Когда Shh является митогеном (как это имеет место в клетках-предшественниках гранулярных нейронов мозжечка или в кроветворных стволовых клетках), мутации с утратой функции в лиганде Hh Patched (PTCH1; желтая звездочка) или мутации с приобретением функции в ингибиторе Patched — Smoothened (SMON; синяя звездочка) активируют сигнальный путь Hedgehog даже в отсутствие Shh или другого белка Hedgehog. **Б.** В аутокринной модели опухолевые клетки и продуцируют лиганд Hh, и реагируют на него. **В.** В паракринной модели опухолевые клетки продуцируют и секретируют лиганд Hh, а окружающие стромальные клетки получают белок Hh. Стромальные клетки отвечают на это производством факторов роста, таких как фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) или инсулиноподобный фактор роста (IGF), которые поддерживают рост или выживание опухоли. GLI — фактор транскрипции, активируемый сигнальным путем Hh. (По данным: L. L. Rubin and F. J. de Sauvage, 2006. *Nat Rev Drug Discov* 5: 1026–1033.)

Sonic hedgehog (Shh), который может действовать одним из двух способов. Во-первых, это аутокринный путь, стимулирующий к росту клетки, которые его продуцируют (рис. 23.17А, Б; Rubin and de Sauvage, 2006; Zhao et al., 2009); в таких случаях, как при некоторых медуллобластомах и лейкозах, ингибиторы Shh-сигнального пути могут останавливать раковый рост. Во-вторых, продуцируемый опухолью Shh может действовать не на опухоль, а на стромальные мезенхимные клетки вокруг нее, стимулируя стромальные клетки продуцировать факторы, которые поддерживают опухолевый рост (рис. 23.17В). Если сигнальный путь Shh заблокирован, опухоль регрессирует (Yauch et al., 2008; 2009; Tian et al., 2009) тератоген циклопамин, который блокирует Shh-сигнализацию и может предупреждать рост некоторых из таких опухолей (Berman et al., 2002; 2003; Thayer et al., 2003; Song et al., 2011).

Таким образом, те же самые химические вещества, которые вызывают тератогенез путем блокады сигнальных путей в эмбриональном развитии, могут быть полезны в блокировании активации раковых стволовых клеток. Даже классический тератоген талидомид ныне «реабilitируют» для использования в борьбе против рака.

ГИПОТЕЗА РАКОВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

В 1971 г. появилось сообщение, что малигнизированную ткань, так же как и нормальную, поддерживают пролиферация и дифференцировка ее стволовых клеток (Pierce and Johnson, 1971). В том же году у опухолей крыс было показано наличие стволовых клеток, которые при пересадке другому животному вызывают такой же вид раковой опухоли (Pierce and Wallace, 1971). Сходство между нормальными стволовыми и раковыми стволовыми клетками особенно проявилось, когда проследивание линий дифференцировки показало, что стволовые клетки кишечных аденом (предшественников рака кишечника) представляют собой клетки Lgr5⁺ и имеют такую же взаимосвязь с клетками Панета (ацидофильными энтероцитами, см. гл. 5), что и нормальные стволовые клетки кишечника (Schepers et al., 2013).

В многочисленных видах опухолей популяция быстро делящихся опухолевых стволовых клеток (CSC) порождает еще большее число раковых стволовых клеток, как и в популяциях сравнительно медленно делящихся дифференцированных клеток (Lapidot et al., 1994; Chen et al., 2012; Driessens et al., 2012; Schepers et al., 2012). Действительно, когда опухолевые клетки трансплантируют от одного животного другому, только CSC могут породить новые гетерогенные опухоли (Gupta et al., 2009; Singh and Settleman, 2010).

Происхождение CSC остается неясным и может различаться у разных типов опухолей. Некоторые

исследователи убеждены, что CSC образуются либо из нормальных стволовых клеток взрослого организма, либо из прогениторных (транзиторных амплифицирующихся) клеток. Вероятно, это относится к раку кишечника, при котором нормальные кишечные стволовые клетки (ответственные за ежедневное обновление всех типов эпителиальных клеток кишки) становятся раковыми стволовыми клетками (de Sousa e Melo et al., 2017). В других случаях CSC, вероятно, формируются, когда эпителиальные клетки начинают (но еще не завершают) эпителио-мезенхимный переход (EMT). Такие EMT обнаружены в развитии клеток нервного гребня и сомитов (см. гл. 15 и 17). Клетки, которые преобразуются в эпителиальную опухоль (карциному), могут претерпевать серию изменений от эпителиальной клетки, тесно связанной с соседними, в мезенхимоподобную клетку, способную перемещаться и формировать новые опухоли (Pastushenko et al., 2018). Эти изменения могут быть индуцированы изменениями в стромальных клетках, окружающих клетку, становящуюся злокачественной.

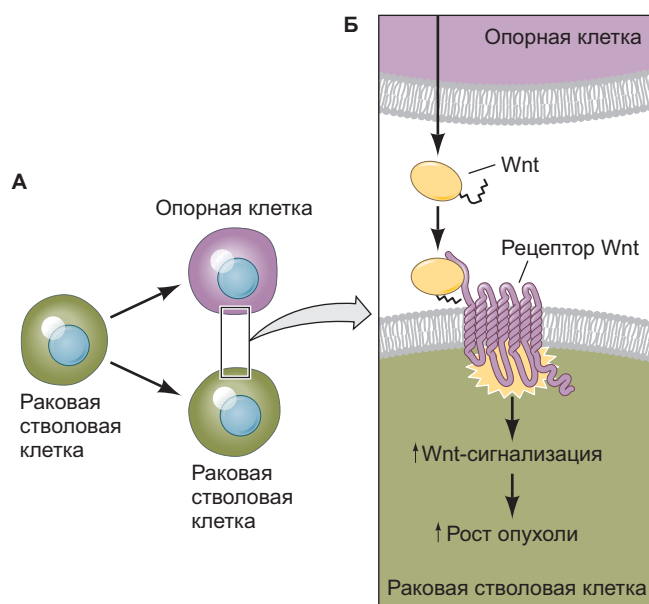


Рис. 23.18. Опухолевые клетки способны создавать собственные ниши. **А.** С помощью проследивания клеточных поколений было обнаружено, что клетки рака легкого делятся, образуя два типа клеток: опухолевые клетки и, что оказалось неожиданным, опорные клетки, которые не являются опухолевыми, но образуют часть ниши опухоли. **Б.** Опорные клетки (показано *пурпурным*) происходят от опухолевых и могут синтезировать и секретировать функциональный белок Wnt. Когда паракринный фактор Wnt связывается с рецептором Wnt на опухолевой клетке (зеленая), он активирует в клетке сигнальный путь Wnt, который поддерживает пролиферацию опухолевых клеток. (По данным: M. Huch and E. L. Rawlins, 2017. *Nature* 545: 292–293.)

Интересно, что CSC создают и собственные ниши. Это более дифференцированные клетки опухоли, чем CSC, которые превращаются в ниши, секретирующие паракринные и юстакринные факторы (такие, как Wnt и Notch), необходимые для дальнейшего роста CSC (рис. 23.18; Lim et al., 2017; Tammela et al., 2017). В некоторых опухолях (например, агрессивных глиобластомах) такие клетки, образующие нишу, могут даже дифференцироваться в эндотелий кровеносных сосудов, создавая таким образом собственную кровеносную систему опухоли (El Hallani et al., 2010; Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010).

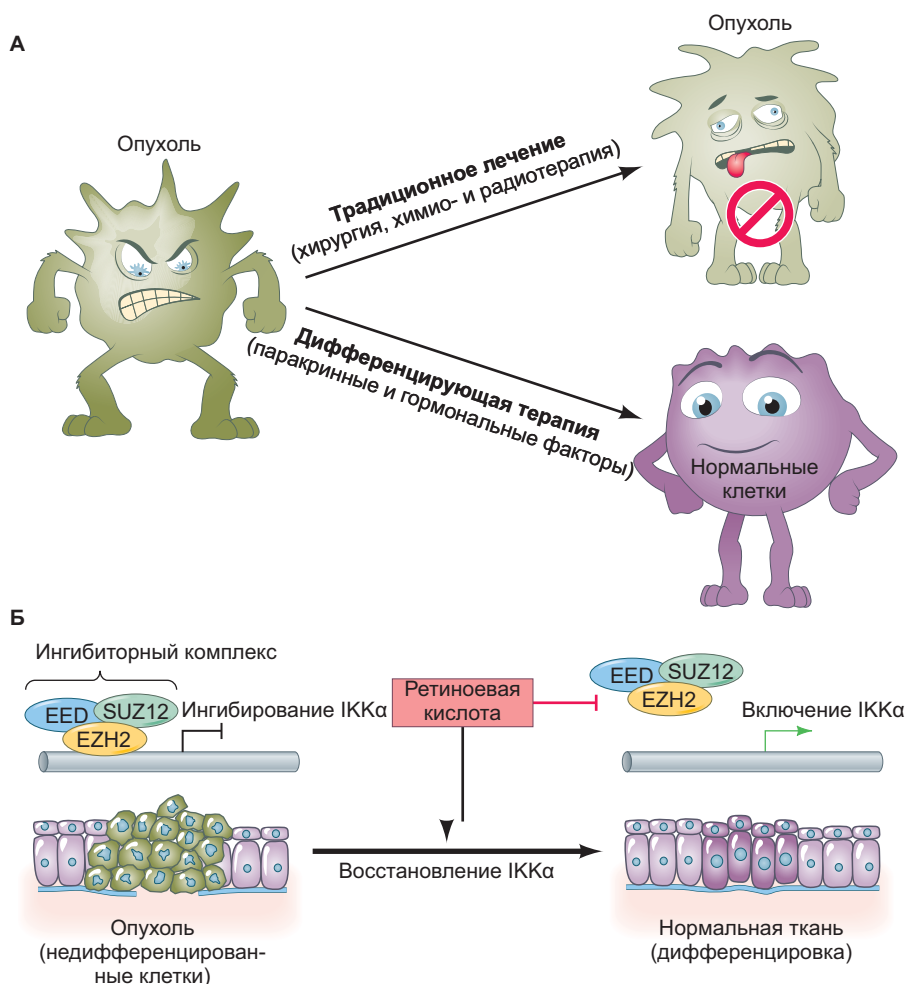
Онкотерапия, основанная на факторах развития

Раковые заболевания — это результат не столько «порчи клеток», сколько нарушения взаимодействий между клетками. Часто это заболевания, связанные с нарушениями сигнализации в развитии, и несколько типов раковых клеток могут быть нормализованы, если их поместить в участки эмбрионов, которые экспрессируют определенные паракринные факторы

или их ингибиторы. Такой взгляд на онкологические заболевания с точки зрения биологии развития позволяет находить новые пути их лечения. Один из них — **дифференцирующую терапию** — считали возможной еще 40 лет назад, но она была тогда нереализуема практически.

В 1978 г. было показано, что опухолевые клетки во многих случаях могут быть преобразованы в эмбриональные, и выдвинута гипотеза, что они могут быть возвращены в нормальные, если заставить их пройти дифференцировку (Pierce et al., 1978). В том же году обнаружено, что некоторые виды лейкемии можно контролировать, если заставить клетки лейкемии дифференцироваться, а не пролиферировать (Sachs, 1978). Один из таких видов лейкемии — острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) — вызван соматической рекомбинацией, формирующей «новый» фактор транскрипции, одна из субъединиц которого представляет собой рецептор ретиноевой кислоты. Этот рецептор, даже в отсутствие ретиноевой кислоты, взаимодействует с сайтом связывания ретиноевой кислоты ДНК, где он подавляет гены, реагирующие на ретиноевую кислоту, а также создает большую структуру конденсированного хроматина (Nowak et al., 2009). Экспрессия такого

Рис. 23.19. Дифференцирующая терапия. **А.** Тогда как традиционные способы лечения раковых заболеваний (хирургия, химиотерапия и облучение) направлены на уничтожение раковых клеток, дифференцирующая терапия основана на концепции, согласно которой опухоль представляет собой нарушение развития и ее клетки можно заставить стать нормальными «взрослыми» клетками. **Б.** Ретиноевая кислота может индуцировать превращение клеток злокачественной носоглоточной карциномы в нормальные взрослые клетки. Клетки носоглоточной карциномы выглядят как недифференцированные клетки шеи, а фермент ИКК α эпигенетически подавлен комплексом, содержащим энхансер гомолога 2 zeste (EZH2) (слева). Воздействие РК предупреждает формирование такого ингибиторного комплекса и восстанавливает экспрессию ИКК α . Клетки опухоли дифференцируются в нормальные клетки (справа). (По данным: M. Yan and Q. Liu, 2016. *Chin J Cancer* 35: 3.)



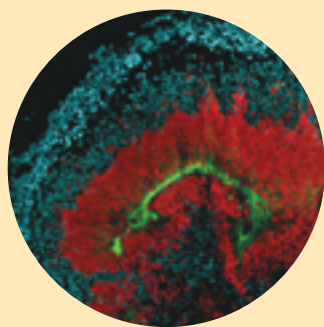
«нового» фактора транскрипции в клетках-предшественниках нейтрофилов вызывает их малигнизацию (Miller et al., 1992; Grignani et al., 1998). Лечение страдающих ОПЛ пациентов третиноином (полностью *транс*-ретиноевой кислотой) более чем в 90% случаев приводит к ремиссии вследствие того, что добавленная ретиноевая кислота может влиять на дифференцировку лейкемических клеток в нормальные нейтрофилы (Hansen et al., 2000; Fontana and Rishi, 2002). Терапия ретиноевой кислотой восстанавливает также нормальную дифференцировку клеток в носоглоточных карциномах (рис. 23.19; Yan et al., 2014; Yan and Liu, 2016).

Послесловие

Биология развития приобретает все возрастающее значение для современной медицины. Профилактическая медицина, общественное здравоохранение и сохранение биоразнообразия требуют, чтобы мы

лучше знали механизмы, которыми промышленные химические и лекарственные вещества могут причинить вред эмбрионам. Возможность эффективно и недорого проверять химические соединения на потенциальный вред приобрела критическую важность. Биология развития предоставляет новые подходы к пониманию канцерогенеза, предупреждению и лечению онкологических заболеваний. И наконец, она дает объяснение тому, как мутировавшие гены и анеуплоидии формируют характерные для них аномальные фенотипы.

Очень важно понимать и то, что агенты, которые мы вводим в окружающую среду, косметика, которую мы наносим на кожу, и вещества, которые мы едим и пьем, могут влиять на развивающийся эмбрион, плод и личинку. Физиология развивающихся организмов, когда они формируют свой фенотип, отличается от физиологии, когда он просто поддерживается и химические вещества, безвредные для взрослых, могут нарушить развитие эмбрионов. Поэтому, чтобы вырастить эмбрион, требуются усилия человеческого общества.



Из: Nowakowski et al., 2016. *Cell Stem Cell* 18: 591–596

О фотографии в начале главы

На срезе мозгового органоида, происходящего из стволовых клеток («мини-мозг в чашке»), радиальные глиальные клетки, которые функционируют как нейральные стволовые клетки, окрашены красным, а зрелые нейроны — голубым. Зеленый краситель связывается с рецепторными белками AXL у основания нейральных стволовых клеток. Мембранносвязанные рецепторные белки не обнаруживаются в большинстве других клеток, но присутствуют с большой плотностью в нейральных стволовых клетках в ходе второго триместра беременности у человека, когда вовлекаются в клеточное деление. Полагают, что вирус Зика присоединяется к белкам AXL, чтобы проникнуть в клетки (Nowakowski et al., 2016; Persaud et al., 2018).

23

Коротко Нормальное развитие и патология

1. Аномалии развития вследствие генетических нарушений и влияния окружающей среды приводят к сравнительно низкому уровню выживания всех оплодотворенных яйцеклеток человека.
2. Случай играет важную роль в ходе развития. Существуют большие вариации в числе транскрипций и трансляций, так что в разные моменты времени клетки производят больше или меньше важных для развития белков.
3. Плейотропия имеет место, когда несколько разных эффектов обусловлены одним геном. При мозаичной плейотропии каждый эффект вызван независимо экспрессией одного и того же гена в разных тканях. При относительной плейотропии аномальная экспрессия гена в одной ткани влияет на другие ткани, даже когда эти ткани не экспрессируют этот ген.
4. Генетическая гетерогенность имеет место, когда мутации в более чем одном гене могут давать одинаковые фенотипы. Фенотипическая гетерогенность возникает, когда один и тот же ген может продуцировать разные дефекты (или разную выраженность одного и того же дефекта) у разных индивидов.
5. Тератогенные агенты включают химические вещества, такие как алкоголь и ретиноевая кислота, тяжелые металлы, некоторые патогены и ионизирующее

излучение. Все они негативно влияют на нормальное развитие и могут приводить к врожденным порокам и функциональным недостаточностям.

- Возможны множественные эффекты алкоголя на клетки и ткани, которые приводят к синдрому умственных и физических аномалий.
 - Ретиноевая кислота активна в ходе развития, и ее избыток или недостаток может приводить к врожденным аномалиям.
6. Вещества, нарушающие работу эндокринной системы, могут связываться с рецепторами гормонов или блокировать эти рецепторы или блокировать синтез гормонов, их транспорт или экскрецию. В настоящее время бисфенол А и другие соединения, нарушающие эндокринную сферу, рассматривают как возможную причину снижения продукции спермиев у мужчин и предрасположенности к раку груди у женщин.
- Эстрогены из окружающей среды могут вызывать аномалии репродуктивной системы, подавляя экспрессию гена *Nox* и сигнальный путь *Wnt*.

- В некоторых случаях вещества, нарушающие эндокринную систему, метилируют ДНК и такой паттерн метилирования может наследоваться из поколения в поколение.

7. Онкологические заболевания можно рассматривать как болезни нарушенного развития. Такие болезни могут метастазировать подобно эмбриональной клеточной подвижности, а ряд опухолей утрачивают злокачественность, когда их помещают в среду, которая поддерживает нормальный морфогенез и подавляет избыточную клеточную пролиферацию.

- Онкологические заболевания могут возникать вследствие нарушений межклеточных взаимодействий. Такие нарушения включают в себя изменения в синтезе паракринных факторов.
- Во многих случаях опухоли содержат популяцию быстро делящихся раковых стволовых клеток, которые образуют новые раковые стволовые клетки, а также новые покоящиеся и дифференцированные клетки. Дифференцированные клетки могут действовать как ниша для раковых стволовых клеток.

Развитие и эволюция:

механизмы биологии развития в эволюционных изменениях

Какие изменения в развития могли
потребоваться для эволюции
нелетающего млекопитающего
в летучую мышь?



С разрешения R. R. Behringer

Когда Чарльз Дарвин писал «Происхождение видов», он консультировал своего друга Томаса Хаксли по вопросу о происхождении изменчивости. В ответе Дарвину Хаксли отметил, что многие различия между организмами могут быть прослежены по различиям в их развитии и что эти различия — результат не столько развития новых частей организма, сколько модификации уже существующих частей, общих для обоих дивергирующих типов (Huxley, 1857).

В ответе Хаксли выражена основная идея **эволюционной биологии развития**, сравнительно новой науки, рассматривающей эволюцию как результат изменений в развитии. Если развитие — это изменение экспрессии генов и положения клеток во времени, тогда эволюция — это изменение развития во времени. Эта новая научная сфера, именуемая на английском научном жаргоне **evo-devo**¹, формирует новую модель эволюции, которая интегрирует биологию развития, палеонтологию и популяционную генетику для объяснения и описания биоразнообразия (Raff, 1996; Hall, 1999; Arthur, 2004; Carroll et al., 2005; Kirschner and Gerhart, 2005). Иными словами, эволюционная биология развития связывает генетику и эволюцию посредством фактора развития. Как подметил в 1942 г. внук Томаса Хаксли Джулиан, исследование эффектов генов в ходе развития так же существенно для понимания эволюции, как исследование мутаций и отбора. Современная эволюционная биология развития анализирует, как изменения в развитии могут создавать разнообразные вариации, над которыми может трудиться естественный отбор. Вместо того чтобы сосредоточиваться на «выживании наиболее приспособленных», эволюционная биология развития дает нам новое понимание того, как «достигается наибольшая приспособленность» (Carroll et al., 2005; Gilbert and Epel, 2015).

¹ От evolution — эволюция и development — развитие. (Прим. перев.)

Модель генетики развития в эволюционных изменениях

Предпосылки эволюции

Структура развития в геноме

Если естественный отбор может оперировать только уже существующими вариантами, откуда все эти варианты могут взяться? Если, как заключили Дарвин (Darwin, 1868) и Хаксли, разнообразие возникает вследствие изменений в развитии, тогда как может изменяться развитие эмбриона, если оно так сложно и тонко организовано? Как такие изменения могут произойти без того, чтобы не погиб весь организм?¹ Ответы на вопросы оставались тайной, пока эволюционные биологи развития не продемонстрировали, что крупные морфологические изменения могут возникать в ходе развития по двум принципам, лежащим в основе развития всех многоклеточных организмов: модульности и молекулярной экономии.

Модульность: дивергенция через диссоциацию

Одно из важнейших открытий эволюционной биологии развития состоит не только в том, что анатомические части организма модульны (поэтому одна часть организма может развиваться иначе, чем другие), но и в том, что участки ДНК, формирующие энхансеры генов, тоже модульны. Генетическая модульность означает, что может существовать множество энхансеров к каждому гену и что каждый энхансерный участок может иметь сайты связывания с многими факторами транскрипции. Модульность энхансерных элементов позволяет конкретным наборам генов активироваться совместно, а отдельным генам — экспрессироваться в нескольких разных местах. Таким образом, если в результате мутации какого-то гена утрачивается или приобретает модульный энхансерный элемент, организм, содержащий такой набор энхансеров, будет экспрессировать этот ген в иных местах или в иное время, чем организм с исходной аллелью. Такая изменчивость может привести к развитию новых анатомических и физиологических черт (Sucena and Stern, 2000; Shapiro et al., 2004), а крупные морфологические изменения могут возникать в результате мутаций в регуляторных участках ДНК. Таким образом, модульность энхансеров может быть очень существенна в формировании вариантов отбора. Действительно, мутации, влияющие на энхансерные последовательности, ныне считают наиболее важными для возникновения морфологических расхождений

между группами животных (Carroll, 2008; Stern and Orgogozo, 2008).

PITX1 И ЭВОЛЮЦИЯ КОЛЮШКИ

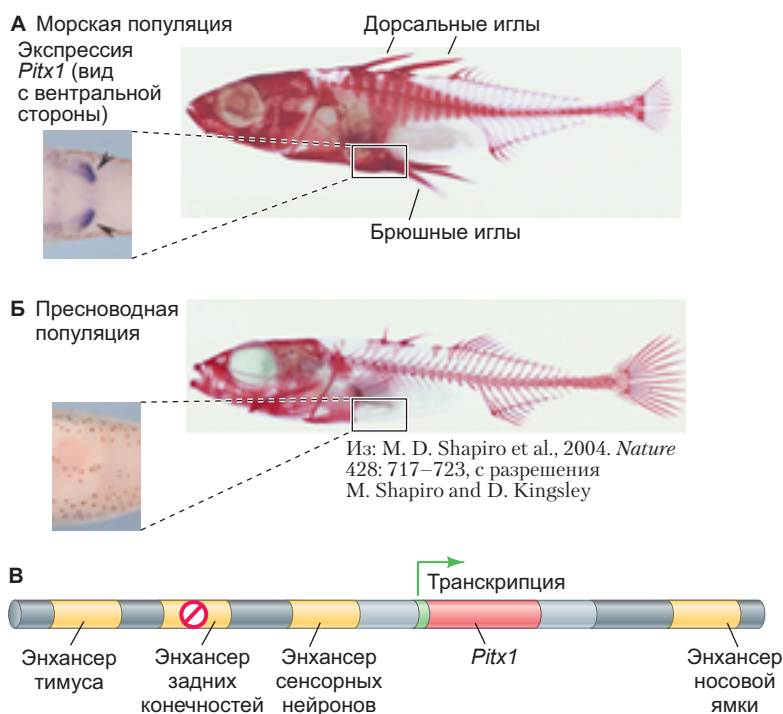
Важность модульности энхансеров была ярко продемонстрирована в результате анализа эволюции одной из рыб — трехиглой колюшки (*Gasterosteus aculeatus*)². Пресноводные колюшки произошли от морских около 12 000 лет назад, когда морские популяции колонизировали в конце последнего оледенения новообразованные озера. У морских колюшек (рис. 24.1А) для защиты от хищных рыб имелись брюшные иглы, которые могли поранить пасть хищнику, пытавшемуся колюшку съесть. Пресноводные колюшки брюшных игл не имеют (рис. 24.1Б), возможно, потому, что не сталкиваются с хищными рыбами, как морские, а вместо этого имеют дело с хищниками беспозвоночными, которые легко могли бы ухватить колюшку за эти самые иглы.

Чтобы определить, какие гены могут быть связаны с такими различиями брюшка, исследователи скрещивали особи из морской (имеющей иглы) и пресноводной (без игл) популяций. Получившееся потомство скрещивалось внутри себя и дало многочисленные варианты, часть из которых имели брюшные иглы, а часть нет. С помощью молекулярных маркеров, идентифицирующих специфические участки родительских хромосом, Шапиро с сотрудниками (Shapiro et al., 2004) обнаружили, что основной ген развития брюшной иглы расположен в дистальном конце хромосомы 7. После тестирования многочисленных генов-кандидатов в этом участке (например, генов, активность которых у мышей связана со структурами живота и задних конечностей мыши) было обнаружено, что там располагается ген, кодирующий фактор транскрипции *Pitx1*.

Когда Шапиро и его сотрудники сравнили аминокислотные последовательности белков *Pitx1* морских и пресноводных колюшек, они не обнаружили различий. Однако между паттернами экспрессии гена *Pitx1* обнаружилось критически важное различие. В обеих популяциях *Pitx1* экспрессировался в клетках-предшественниках тимуса, носа и сенсорных нейронов. В морской популяции *Pitx1* экспрессировался также в брюшной области, а в пресноводной популяции экспрессия *Pitx1* здесь отсутствовала или была резко уменьшена (рис. 24.1В). Поскольку кодирующий уча-

¹ Решение этой проблемы критично для опровержения аргументации тех, кто отрицает эволюцию как источник биоразнообразия. Большинство сторонников идей креационизма допускают микроэволюцию (которая ограничивается изменениями внутри вида), но отрицают макроэволюционные изменения (между видами и образованием видов), рассматриваемые в данной главе.

² Латинское научное название рыбы переводится как «костистое брюхо с иголками»



сток *Pitx1* не мутировал, а различие между пресноводной и морской популяциями связано с паттерном экспрессии этого гена, был сделан обоснованный вывод, что энхансерный участок, позволяющий экспрессию *Pitx1* в брюшной области (т. е. энхансер брюшных игл), не функционирует у пресноводной популяции.

Этот вывод подтвердился, когда генетическое картирование высокого разрешения показало, что ДНК энхансера *Pitx1* «задних конечностей» различается у колюшек, имеющих и не имеющих брюшные иглы (Chan et al., 2010)¹. Когда этот фрагмент ДНК величиной в 2,5 т.п.н. морской (имеющей иглы) рыбы сшивали с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP) и вводили в оплодотворенные яйцеклетки пресноводной колюшки, GFP экспрессировался в брюшной области. Более того, когда этот же самый фрагмент, взятый у морских колюшек, помещали за кодирующей последовательностью *Pitx1* пресноводной (не имеющей игл) рыбы, а затем инъецировали в оплодотворенные яйцеклетки не имеющей игл рыбы, брюшные иглы формировались и у пресноводной рыбы. При его трансляции *Pitx1* функционирует, связываясь с энхансером гена *Tbx4*, активирующего гены, которые запускают развитие задних конечностей (Logan and Tabin, 1999; см. гл. 19).

¹ Интересно, что утрата брюшных игл у нескольких популяций колюшки, вероятно, является результатом независимой утраты домена экспрессии *Pitx1*. Возможно, что, если имеет место утрата экспрессии *Pitx1* в брюшной области, такой признак легко подвергается отбору (Colosimo et al., 2004). Здесь мы видим, что, благодаря комбинации подходов популяционной генетики и генетики развития, можно определить возможные механизмы эволюции.

Рис. 24.1. Эволюция, основанная на модульности энхансера в ходе развития. Утрата экспрессии гена *Pitx1* в брюшной области у пресноводной популяции трехиглой колюшки (*Gasterosteus aculeatus*). **А.** Костные пластинки и брюшные иглы характеризуют морскую популяцию этого вида. **Б.** У пресноводной популяции брюшные иглы отсутствуют, как и большая часть костного панциря. На увеличенном фото вентральной стороны эмбрионов (фото на врезке) методом гибридизации *in situ* показана экспрессия *Pitx1* (красным цветом) в брюшной области (как и в сенсорных нейронах, клетках тимуса и в области носа) у особей морской популяции. У пресноводной популяции окрашивание в брюшной области отсутствует, хотя заметно в других местах. Стрелки указывают на экспрессию *Pitx1* в вентральной области, в которой формируются брюшные иглы у морской популяции. **В.** Модель утраты брюшных игл в ходе эволюции. Постулируется наличие четырех энхансерных участков, расположенных рядом с кодирующим участком *Pitx1*. Эти энхансеры управляют экспрессией гена *Pitx1* в тимусе, брюшных иглах, сенсорных нейронах и носовой ямке соответственно. В пресноводной популяции трехиглой колюшки энхансерный модуль брюшных игл (задних конечностей) мутировал, и ген *Pitx1* здесь перестал функционировать. (По данным: M. D. Shapiro et al., 2004. *Nature* 428: 717–723.)

РЕКРУТИРОВАНИЕ

Модульность позволяет рекрутирование (или «кооперацию») всего набора свойств в новые места в организме. В гл. 10 обсуждалось рекрутирование генов, формирующих скелет (скелетогенная программа), в репертуар развития микромеров морских ежей. У большинства групп иглокожих скелетогенные гены активируются только у взрослых особей и участвуют в формировании твердых экзоскелетных пластинок. Однако у морских ежей (но не у каких-либо иных групп иглокожих) набор таких генов находится под контролем двойной отрицательной связи микромеров вследствие изменений в энхансере одного из этих генов. Таким образом, скелет образуют мезенхимные клетки личинки (Gao and Davidson, 2008).

Другой пример рекрутирования мы видим у насекомых в структуре крыла, которая характерна для жуков. Жуки являются одной из наиболее успешных групп животных на нашей планете, насчитывающей около 20% существующих в настоящее время видов животных (Hunt et al., 2007). Они отличаются от прочих насекомых по формированию надкрылья, переднего крыла, заключенного в твердый экзоске-

А

© F1online digitale
Bildagentur GmbH/Alamy

Б



© Jochen Tack/Alamy

Рис. 24.2. Надкрылья — это отвердевшие передние крылья, характерные для жуков *Coleoptera*. Они формируются за счет рекрутирования генетического модуля развития экзоскелета в модуль развития передних дорсальных крыльев. **А.** Надкрылья божьей коровки. Ее передние крылья покрыты экзоскелетом, а задние увеличены. **Б.** Эти «живые драгоценности» из Оксфордского музея естественной истории иллюстрируют разнообразие некоторых видов надкрыльев жуков

лет. Это делает их «живыми драгоценностями»¹, так любимыми натуралистами (**рис. 24.2**)². У жуков, как и у *Drosophila*, ген *Apterous* экспрессируется в дорсальном компартменте имажинального диска крыла, а фактор транскрипции *Apterous* организует ткань для дифференцировки дорсальных структур крыла. Однако у жуков (но не у каких-либо иных известных насекомых) белок *Apterous* активирует также гены экзоскелета в переднем крыле, при этом репрессируя их в заднем крыле (Tomoyasu et al., 2009). Таким образом, новый тип крыла возникает в результате рекрутирования одного модуля (программы развития экзоскелета) в другой (программу развития дорсального переднего крыла).

Молекулярная экономия: дупликация генов и дивергенция

Второй предпосылкой для макроэволюции путем изменений развития является молекулярная экономия, иногда именуемая *small toolkit* — малый набор программ. Другими словами, хотя развитие чрезвычайно сильно различается у разных видов, в развитии всех видов используются одни и те же типы молекул. Факторы транскрипции, паракринные факторы, молекулы адгезии и каскады передачи сигналов поразительно похожи у разных таксонов. Многие каскады передачи сигналов, возможно, развились в одноклеточных простейших и позднее были рекрутированы для активности в составе многоклеточных (Booth and King, 2016; Sébé-Pedros et al., 2016). Эволюция животных, по-видимому, вовлекала эволюцию энхансеров и новых сигнальных путей, особенно с участием BMP и Wnt (Paps and Holland, 2018; Sébé-Pedros

et al., 2018). Это произошло быстро, и развитие медуз и плоских червей основывалось на одном и том же большом наборе факторов транскрипции и паракринных факторов, что и у насекомых и позвоночных (Finnerty et al., 2004; Carroll et al., 2005; Putnam et al., 2007; Ryan et al., 2007; Hejnol et al., 2009).

МАЛЫЙ ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Определенные факторы транскрипции и паракринные факторы (такие как группы BMP, Нох и Рах) обнаружены во всех таксонах животных. На самом деле некоторые гены из «набора», вероятно, выполняют одни и те же функции у многих линий животных. BMP, по-видимому, во всем животном царстве определяют дорсально-вентральную ось (**рис. 24.3А**); гены Wnt и Нох определяют передне-заднюю ось у всех билатерально симметричных (**рис. 24.3В**); а ген *Raxb* вовлечен, вероятно, в спецификацию светочувствительных органов, независимо от того — глаз это моллюска (например, кальмара), насекомого или примата (**рис. 24.3С**)³. Аналогично, гомологи *Otx* специфицируют форми-

¹ В оригинале «living jewels» — живые драгоценности — аллюзия на *jewel beetle* — златки. (*Прим. перев.*)

² И Дарвин, и Уоллес были заядлыми коллекционерами жуков, но лучше всех отразил импозантность этих насекомых генетик Холдэйн (J. B. S. Haldane). Когда священник спросил его, что изучение природы может сказать нам о Боге, Холдэйн ответил, что Бог очень неравнодушен к жукам.

³ Это не означает, что *Raxb* специфицирует только глаз или что *Raxb* не регулируется другими белками в разных таксонах (Lynch and Wagner, 2011).

рование головы и у позвоночных, и у беспозвоночных; и, хотя сердца насекомых и позвоночных очень различны, те и другие формируются при участии *tinman/Nkx2-5* (Erwin, 1999). Определенные микроРНК обнаружены, по-видимому, у всех животных и играют одну и ту же или очень схожую роль

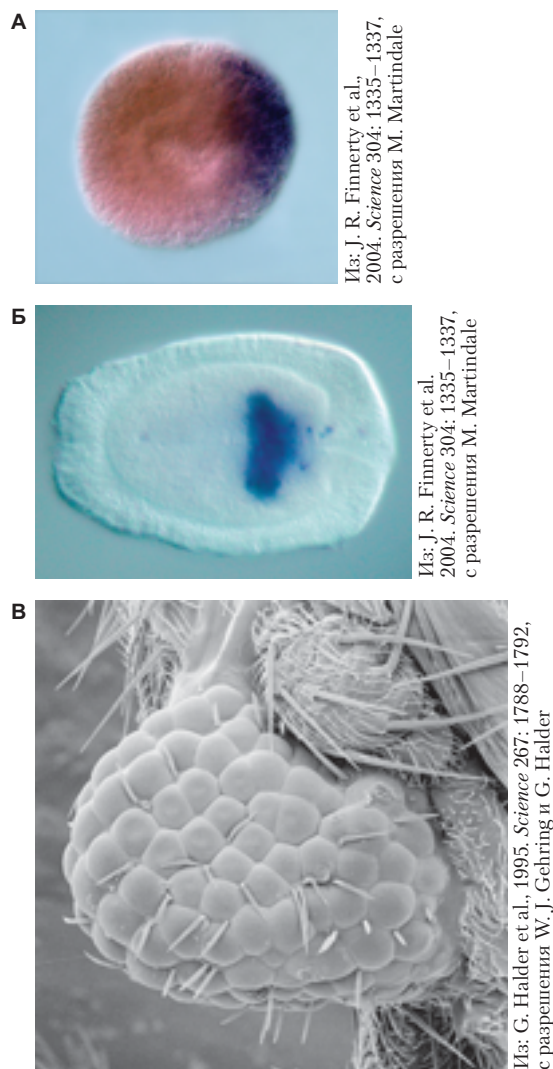


Рис. 24.3. Доказательства эволюционной консервативности регуляторных генов. **А.** Ген квидарий, гомологичный генам позвоночных *Bmp4* и *Drosophila Decapentaplegic*, экспрессируется асимметрично на краю бластопора эмбриона актинии *Nematostella*. Он представляет собой предковую форму данного гена у первичноротых и вторичноротых. **Б.** Ген Нох *Anthox*, член группы паралог 1 генов Нох квидарий, экспрессируется на стороне бластопора личинки актинии. **В.** Ген *Pax6* развития глаз — пример предкового гена и для первичноротых, и для вторичноротых. На микрофотографии показаны омматидии сложного глаза насекомого, сформировавшегося на ноге дрозофилы (первичноротой), в ножном имажинальном диске которой экспрессировалась кДНК *Pax6* мыши (вторичноротой)

в развитии любого таксона, в котором присутствуют (Christodoulou et al., 2010). В их число входит микроРНК-124, которая обнаружена в центральной нервной системе и первичноротых, и вторичноротых; микроРНК-12, присутствующая в кишке во всем животном царстве; микроРНК-92, участвующая в спецификации ресничных локомоторных клеток личинок вторичноротых и первичноротых. Открытие того факта, что одинаковый набор факторов транскрипции и микроРНК вызывает спецификацию одних и тех же типов клеток во всем животном царстве, является мощным аргументом в пользу того, что первичноротые и вторичноротые происходят от общего предка, в котором эти факторы аналогичным образом специфицировали его органы (Davidson and Erwin, 2010).

В некоторых случаях гомологичные пути, образованные гомологичными компонентами, используются в одних и тех же функциях и у первичноротых, и у вторичноротых. Это называют **глубокой гомологией** (Shubin et al., 1997, 2009). Консервативное сходство путей и их функций в обоих случаях, сохраняющееся в течение миллионов лет филогенетической дивергенции, следует рассматривать как свидетельство глубокой гомологии между этими модулями (Shubin et al., 1997). Одним из примеров служит взаимодействие Chordin/BMP4, рассмотренное в гл. 11. И у позвоночных, и у беспозвоночных Chordin/Short-gastrulation (Sog) ингибирует латерализующий эффект BMP4/Decapentaplegic (Dpp), благодаря чему эктодерма, защищенная Chordin/Sog, становится нейрогенной эктодермой¹. Эти реакции настолько схожи, что белок Dpp *Drosophila* способен индуцировать вентрализацию у шпорцевой лягушки *Xenopus* и замещать собой Sog (рис. 24.4; Holley et al., 1995).

ДУПЛИКАЦИЯ И ДИВЕРГЕНЦИЯ

Одним из фактов, который постоянно всплывает при исследованиях паракринных и транскрипционных факторов, является тот, что эти белки (и гены, которые их кодируют) образуют семейства (Holland et al., 2017). Как такие генные семейства возникли? Ответ: в дупликации оригинальных генов и в их последующей независимой мутации (рис. 24.5). Так образуются семейства генов, которые связаны общим происхождением (и часто соседствуют друг с другом). Такой сценарий **дупликации и дивергенции** можно наблюдать на генах Нох, генах глобинов, ге-

¹ Кроме центральной ингибиторной реакции, существуют и другие реакции, которые вносят вклад в глубокую гомологию инструкций по формированию нервной системы у первично- и вторичноротых. Белки BMP и Chordin, участвующие в диффузии и стабильности, консервативны и у насекомых (Larrain et al., 2001).

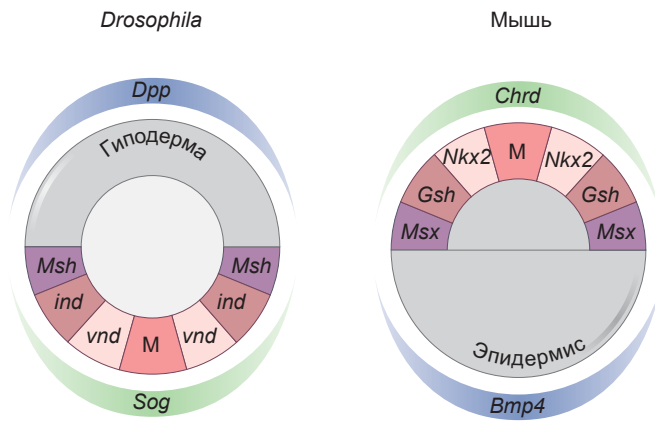


Рис. 24.4. Один и тот же набор инструкций формирует нервные системы и первичноротых, и вторичноротых. У *Drosophila* (первичноротой) член надсемейства TGFβ *Dpp* (*Decapentaplegic*) экспрессируется дорсально, в отличие от *Short-gastrulation* (*Sog*), экспрессирующегося вентрально. У мыши (вторичноротой) член надсемейства TGFβ *Bmp4* экспрессируется вентрально, в отличие от экспрессирующегося дорсально *Chordin* (*Chrd*), гомолога *Short-gastrulation*. Место высшей концентрации *Chordin*/*Sog* становится срединной линией (М). Срединная линия у позвоночных расположена дорсально, а у насекомых — вентрально, а градиент концентрации белков BMP4 или *Dpp* надсемейства TGFβ активирует гены, специфицирующие участки нервной системы в одинаковом порядке в обеих группах: *vnd*/*Nkx2*, затем *ind*/*Gsh* и, наконец, *Msh*/*Msx*. Схожим образом эти гены экспрессируются и у кишечнодышащих. (По данным: H. Reichert and A. Simeone, 2001. *Philos Trans R Soc Lond B* 356: 1533–1544.)

нах коллагена, генах *Distal-less* и многих семействах паракринных факторов (например, генах Wnt). Каждый член такого семейства генов гомологичен прочим (т. е. сходство их последовательностей является результатом их общего происхождения, а не конвергенции конкретной функции) и именуется **паралогом**. Сусуми Оно (Ohno, 1970), один из создателей концепции генных семейств, сравнил дубликацию генов с коварным преступником, обходящим вокруг пальца надзирателей. Когда «полицейские силы» естественного отбора признают какой-то ген «добропорядочным» (правильно исполняющим свою функцию), дубликат этого гена, необремененный давлением отбора, может мутировать и брать на себя новые функции.

«Субфункционализация» (разделение функций между копиями гена) была показана для многих семейств генов, включая гены Нох. Последние представляют собой особенно сложный и важный случай дубликации и дивергенции. Обнаружено, что: 1) существуют родственные гены Нох в каждой группе животных (такие как *Deformed*, *Ultrabithorax* и *Antennapedia* у *Drosophila*, или 39 генов Нох у млекопитающих); 2) существует несколько кластеров генов Нох у позвоночных (например, 39 генов Нох млекопитающих собраны в кластеры на четырех разных хромосомах). Сходство всех генов Нох лучше всего объясняет происхождение от общего предкового гена. Это означает, что у *Drosophila* гены *Deformed*, *Ultrabithorax* и *Antennapedia* возникли как дубликация оригинального гена. Паттерны последовательности этих трех генов (особенно в области гомеодомена) весьма консервативны. Ученые полагают, что тандемные генные дубликации возникают в результате ошибок репликации ДНК, и такие ошибки нередки.

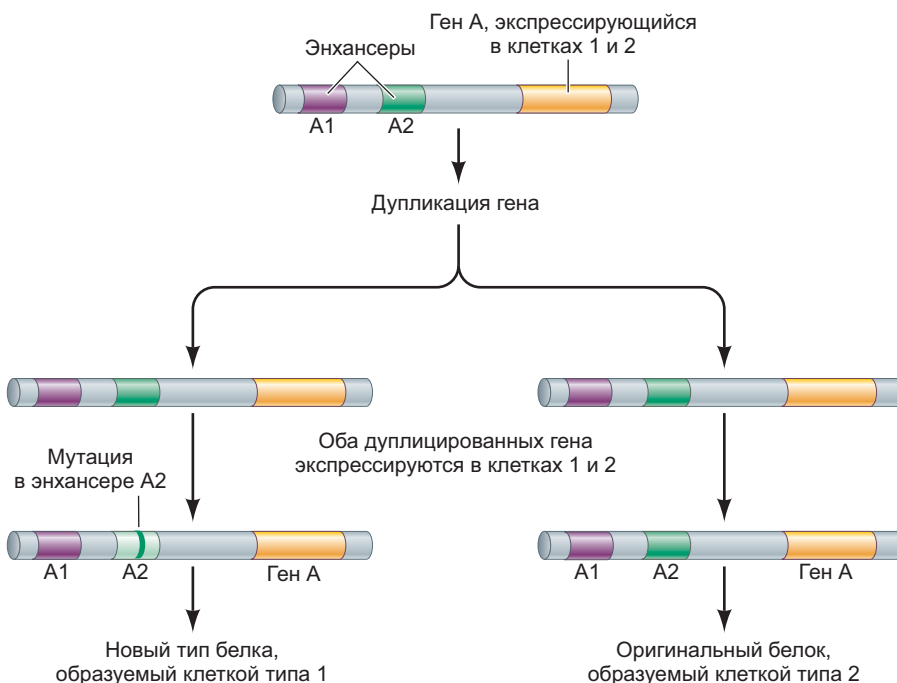


Рис. 24.5. Дубликация и дивергенция. За дубликацией гена, который экспрессируется в нескольких различных типах клеток, может следовать его мутация. Она может приводить к разделению первичной функции гена, так что каждый из дублицированных генов начинает экспрессироваться в разных типах клеток. В описанном здесь гипотетическом случае мутация в энхансере одного из дублицированных генов ведет к формированию нового паттерна экспрессии гена и к различию функциональных белков в клетке типа 1

Будучи реплицированными, копии гена могут дивергировать вследствие случайных мутаций в кодирующей последовательности и энхансерах, образуя отличный паттерн экспрессии и приобретая новые функции (Lynch and Conery, 2000; Damen, 2002; Locascio et al., 2002).

Каждый ген Нох *Drosophila* имеет гомолог (а иногда несколько) у позвоночных. В некоторых случаях гомология очень велика и может быть видна даже в функции гена. Не только у позвоночных ген *Hoxb4* сходен с последовательностью гомолога *Drosophila*, *Deformed (Dfd)*, но и *HOXB4* человека может выполнять функции *Dfd*, если его ввести в эмбрион *Drosophila*, лишенный *Dfd* (Malicki et al., 1992). Как упоминалось в гл. 12, гены Нох насекомых и человека не просто гомологичны — они расположены в одном и том же порядке на соответствующих хромосомах. Паттерны их экспрессии также удивительно схожи: более близкие к 3'-концу гены Нох экспрессируются ближе к передней части эмбриона (см. рис. 12.20)¹. Таким образом, эти гены гомологичны у разных видов (в отличие от членов семейства генов, гомологичных внутри одного вида). Гены, гомологичные у разных видов, называются **ортологичными**.

Одним из наиболее важных событий дупликации гена в эволюции человека могла быть дупликация гена *SRGAP2*, который мог способствовать экспансии коры головного мозга человека. Белок, кодируемый этим геном, экспрессируется в коре мозга млекопитающих и, по-видимому, *замедляет* клеточное деление и уменьшает длину и плотность дендритных отростков. Однако человек отличается от всех других животных (включая шимпанзе) тем, что у него этот ген дублирован дважды. Более того, вторая дупликация не была полной, так что один из новообразованных генов дублирован только частично. «Частичный» ген продуцирует усеченный белок *SRGAP2* — *SRGAP2C*, который тоже образуется в коре головного мозга и *ингибирует* активность нормального *SRGAP2*, образуемого полным геном. В результате клеточное деление в коре головного мозга продолжается в течение более длительного периода времени, а дендриты становятся больше и образуют больше контактов (рис. 24.6; Charrier et al., 2012; Dennis et al., 2012). С учетом геномных данных рассчитано, что это событие ген-

ной дупликации имело место около 2,4 млн лет назад — приблизительно во времена существования австралопитека, увеличения размера мозга приматов и первого свидетельства использования орудия труда (Tyler-Smith and Xue, 2012).

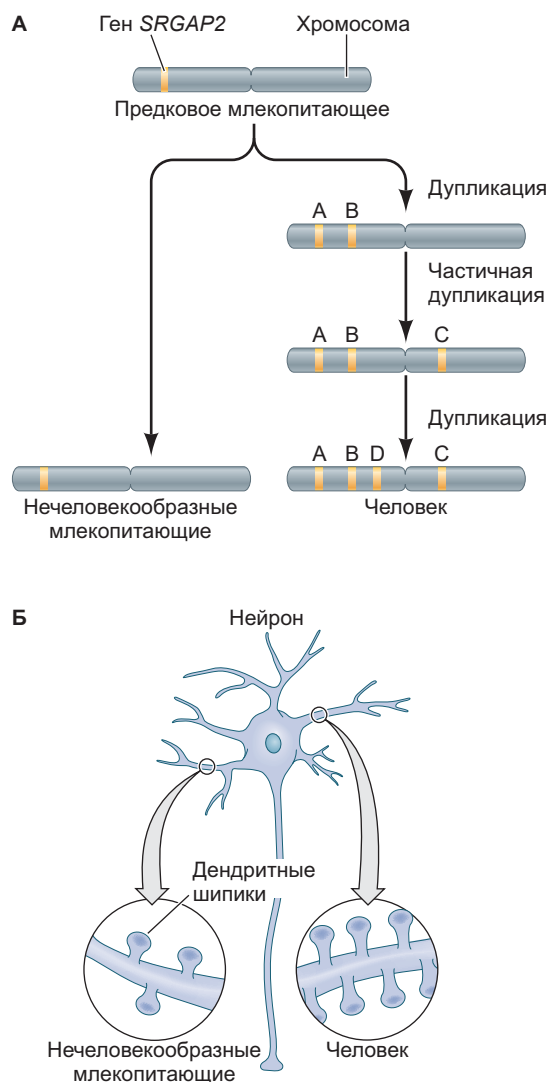


Рис. 24.6. Дупликация и дивергенция гена *SRGAP2* человека. **А.** Ген *SRGAP2* обнаружен в виде единственной копии в геномах всех млекопитающих, за исключением человека. В линии, приведшей к возникновению человека, дупликации образовали четыре варианта гена (обозначены А–D). **Б.** «Предковый» ген *SRGAP2A* при меньшем вкладе *SRGAP2B* и *D* делает возможным формирование дендритных шипиков на поверхности нейронов. *SRGAP2C* представляет собой частичную дупликацию, а его продукт ингибирует *SRGAP2A*, замедляя формирование дендритных шипиков и запуская миграцию нейронов. Эта частичная дупликация могла способствовать удлинению в эволюции времени формирования шипиков и большей пластичности человеческого мозга. (По данным: D. H. Geschwind and G. Konopka, 2012. *Nature* 486: 481–482.)

¹ Гены Нох, по-видимому, были важны в спецификации оси еще до того, как развилась билатеральная симметрия (He et al., 2018; Technau and Genikhovich, 2018). Однако их белки не следует рассматривать как прямо специфицирующие сегменты организма. Точнее, они являются посредниками, выполняющими регионально специфические инструкции от других, не связанных с Нох процессами, такими как градиенты FGF у позвоночных и гены *gap* у насекомых. Различные комбинации генов Нох делают возможной клеточную пролиферацию и клеточную адгезию тканеспецифичным образом (Gawne et al., 2018; Mallo, 2018).

Механизмы эволюционных изменений

В 1975 г. Мэри-Клэр Кинг и Аллен Уилсон опубликовали статью под названием «Двухуровневая эволюция у человека и шимпанзе» (King and Wilson, 1975). Их исследование показало, что, несмотря на большие анатомические различия между шимпанзе и человеком, их ДНК, кодирующие белки, почти идентичны. Различия были обнаружены в регуляторных генах, которые действуют в ходе развития.

Различия организмов шимпанзе и человека... в основном результат генетических изменений в небольшом числе регуляторных систем, тогда как аминокислотные замены в целом редко являются ключевыми факторами в значительных адаптивных сдвигах.

Иными словами, аллельные замены генов, которые кодируют белковые последовательности и выглядят почти одинаковыми у шимпанзе и человека, не кажутся важными для крупномасштабной эволюции. Это подтвердилось последующими геномными исследованиями (Deline et al., 2018). Важные различия состоят в том, где, когда и как большинство генов активируется. В 1977 г. идея о том, что изменения в регуляции генов в ходе развития критичны для эволюции, была выдвинута нобелевским лауреатом Франсуа Жакобом, способствовавшим выработке оперонной модели регуляции генов. Во-первых, Жакоб заявил, что эволюция работает с тем, что имеет: она комбинирует существующие элементы новыми способами, а не создает новые. Во-вторых, он предсказал, что такая «перелицовка» более вероятна в тех генах, которые конструируют эмбрион, а не в тех, которые функционируют во взрослых организмах (Jacob, 1977).

Уоллес Артур (Arthur 2004) перечислил четыре варианта, по которым жакобовская «перелицовка» может реализовываться на уровне экспрессии генов с формированием фенотипических вариантов, доступных для естественного отбора:

- 1) гетеротопия (изменения локации);
- 2) гетерохрония (изменения по времени);
- 3) гетерометрия (изменения количества);
- 4) гетеротипия (изменения по типу).

Эти изменения могут осуществляться, только если паттерны экспрессии гена модульны, т. е. контролируются разными энхансерными элементами. Модульность развития позволяет одной части организма меняться без необходимости влиять на другие части¹.

Гетеротопия

Один из важных путей создания новых структур — изменение места, в котором фактор транскрипции или паракринный фактор экспрессируется. Это про-

странственное изменение экспрессии гена называют **гетеротопией** (в пер. с греч. — другое место). Гетеротопия позволяет различным клеткам приобретать новые свойства (как микромерам морских ежей, когда они рекрутировали гены формирования скелета; см. гл. 10) или активировать или ингибировать процесс, опосредованный паракринным фактором в новой области тела (например, когда Gremlin ингибирует опосредованный BMP апоптоз областей между пальцами; см. рис. 19.26). Существует множество иных примеров, часть из них будет описана ниже.

КАК ЛЕТУЧАЯ МЫШЬ ПРИОБРЕЛА КРЫЛЬЯ, А ЧЕРЕПАХА — ПАНЦИРЬ

В гл. 1 упоминалось, что крылья летучей мыши возникли в результате изменений в развитии передних конечностей, когда клетки в межпальцевом пространстве перестали погибать. Оказалось, что летучие мыши приобрели перепонки на передних конечностях путем, очень схожим с тем, каким эмбрионы утки приобретают перепонки на задних конечностях — за счет блокады BMP, которые в противном случае вызвали бы апоптоз клеток в межпальцевых участках. Сигнализация и Gremlin, и FGF, по-видимому, блокирует функции BMP в крыле летучей мыши. В отличие от прочих млекопитающих, у летучих мышей в межпальцевых участках экспрессируется Fgf8, а этот белок критичен для поддержания существования здесь клеток. Если сигнализация FGF ингибирована (таким веществом, как SU5402), BMP могут индуцировать апоптоз перепонки передних конечностей, как у остальных млекопитающих (Laufer et al., 1997; Weatherbee et al., 2006). Fgf8 в перепонках, по-видимому, ответствен и за передачу митотического сигнала, который удлиняет пальцы летучей мыши, таким образом увеличивая ее крылья (Hockman et al., 2008; Sears, 2008).

В формирование панциря черепах тоже вовлечены BMP и FGF, но иным образом. Отличие черепах от других позвоночных в том, что их ребра мигрируют латерально в кожу вместо того, чтобы образовывать грудную клетку (рис. 24.7). Определенные участки кожи черепахи привлекают клетки-предшественники ребер и отличаются от таковых участков у других позвоночных, поскольку синтезируют Fgf10. Вероятно, Fgf10 привлекает ребра, поскольку ребра

¹ Данная глава сконцентрирована на изменениях, происходящих на уровне транскрипции, которые могут генерировать новые морфологические формы, однако морфологические изменения могут быть инициированы и на этом уровне. Например, было показано, что посттранскрипционная регуляция гена *Sex combs reduced* критична для преобразования ходильных ног в ногочелюсти у мокрицы — наземного ракообразного *Porcellio scaber* (Abzhanov and Kaufman, 1999).

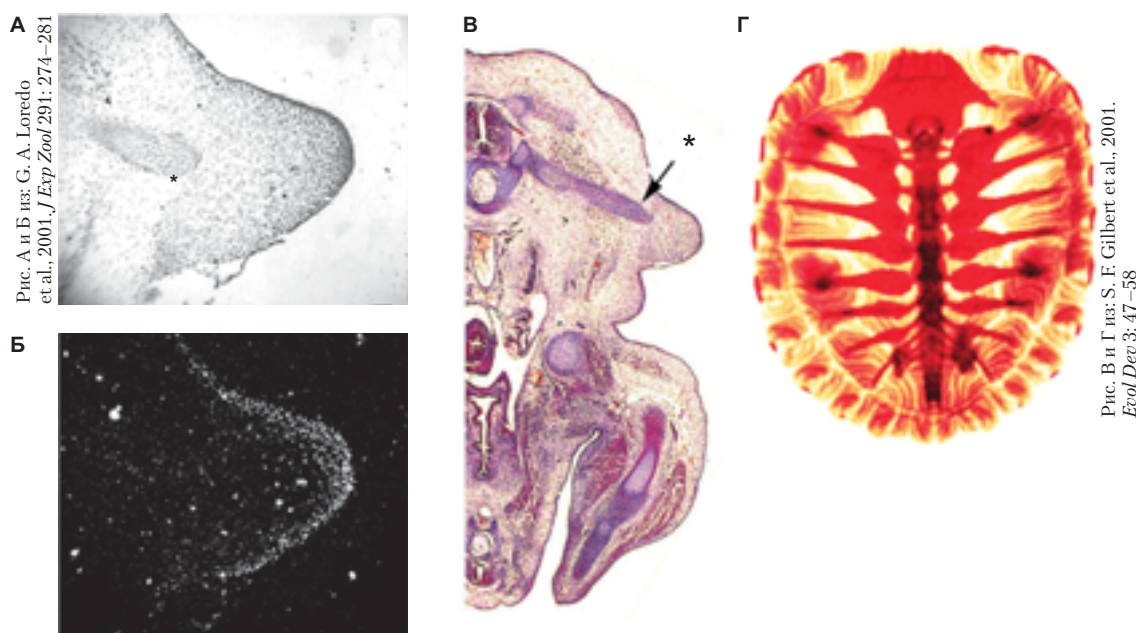


Рис. 24.7. Гетеротопия на нескольких уровнях в развитии черепахи. Карапакс (спинной панцирь) черепахи образован несколькими слоями гетеротопий. Экспрессия *Fgf10* в определенных участках кожи индуцирует латеральную миграцию клеток-предшественников ребер в кожу, вместо того чтобы они образовывали грудную клетку. **А, Б.** Поперечный срез раннего эмбриона черепахи в период, когда ребра входят в кожу (**А** — в светлом поле; **Б** — авторадиграфическое окрашивание на *Fgf10*). **В.** Половина поперечного среза немного более позднего эмбриона черепахи, демонстрирующая ребро (показано стрелкой). Ребро протягивается от позвонка в область кожи, которая утолщается, образуя панцирь. **Г.** Вылупившаяся черепаха окрашена ализарином красным, чтобы продемонстрировать кости. Кости видны в коже вокруг ребер, которые вошли в кожу. Гетеротопии включают экспрессию *Fgf10*, расположение ребер и костей. Звездочки на (**А**) и (**В**) указывают на мигрирующие клетки ребер

не входят в кожу, если сигнал *Fgf10* блокирован (Burke, 1989; Cebra-Thomas et al., 2005). Оказавшись в коже, клетки ребер делают то, что следует от них ожидать — они претерпевают внутривещное окостенение, при котором хрящевые клетки замещает кость. Для этого вырабатываются ВМР. Однако ребра погружены в кожу, и ее клетки также способны реагировать на ВМР, превращаясь в кость (Cebra-Thomas et al., 2005; Rice et al., 2015). Таким образом, каждое из приобретших новое расположение ребер программирует окружающую его кожу на превращение в кость, и черепаха приобретает панцирь. Эти данные о развитии черепах породили новые теории их эволюционного происхождения (Nagashima et al., 2009; Lyson et al., 2013).

ДВЕ ГУБЫ ТЮЛЬПАНА

Огромное разнообразие покрытосеменных цветковых растений возникло в основном благодаря гомеозисным мутациям (Thiessen, 2010; Moyroud and Glover, 2017). Разнообразие включает формирование лепестков роз, являющихся, вероятно, видоизменением тычинок (Ronse de Craene, 2003; Dubois et al., 2010),

и лепестков тюльпана — видоизменений чашелистиков (**рис. 24.8**; Kanno et al., 2003). Как описано в гл. 6, тип лепестка обусловлен экспрессией генов типа цветковых органов классов А, В и Е, тогда как чашелистики формируются в результате экспрессии генов только класса А и Е. В тюльпанах гены классов А и В можно наблюдать в первых двух кругах цветка (преобразование чашелистиков в лепестки). Когда зародыши *Arabidopsis thaliana* экспериментально индуцируются к экспрессии гена типа цветковых органов класса В в первом круге цветка, растение формирует лепестковоподобные структуры, а не чашелистики (Krizek and Meyerowitz, 1996).

Гетерохрония

Гетерохрония (в пер. с греч. — другое время) представляет собой смещение относительного порядка или времени двух процессов развития. Гетерохрония можно наблюдать на любом уровне развития — от регуляции гена до поведения взрослого животного (West-Eberhard, 2003). При гетерохронии у одного из модулей изменяется время экспрессии или скорость роста относительно других модулей эмбриона.

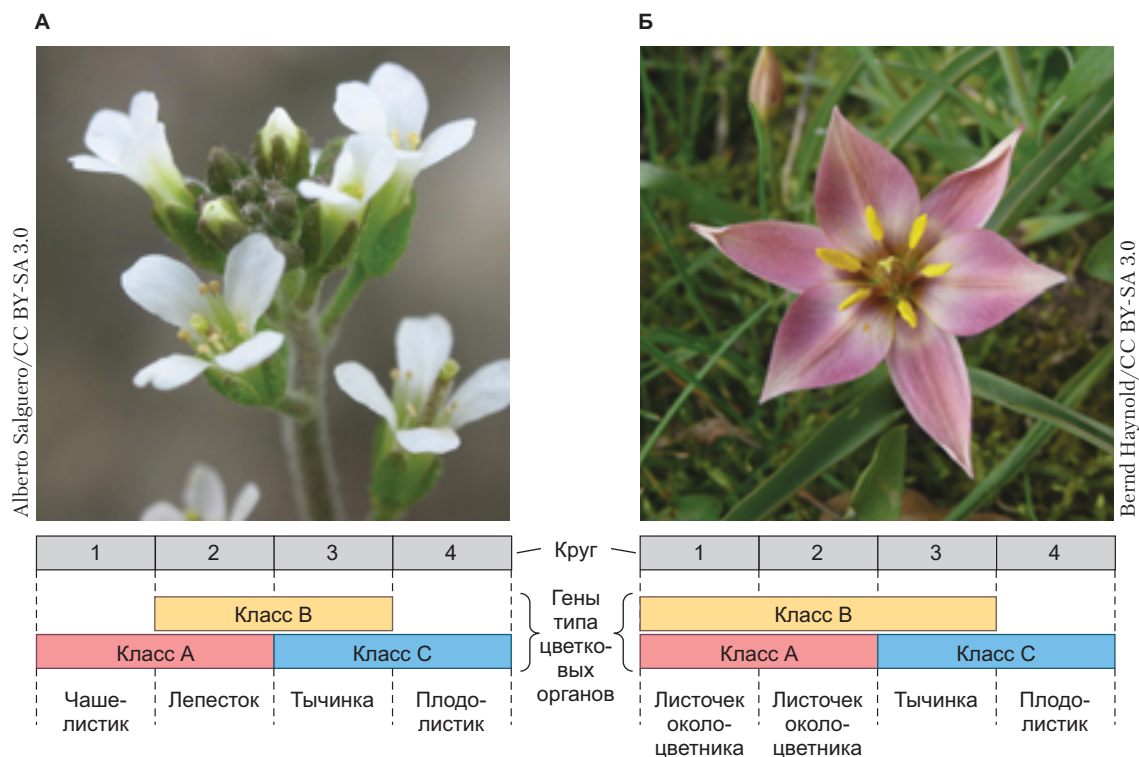


Рис. 24.8. А. Типы цветковых органов, специфицированные в соответствии с классическими границами генов в модели ABCDE *Arabidopsis thaliana*. Б. В тюльпане границы изменены так, что гены класса В также экспрессируются в первом круге цветка, вызывая формирование чашелистиков, подобных лепестку (листочек околоцветника). (Рис. А, Б по данным: E. Moynoud and B. Glover, 2017. *Curr Biol* 27: R941–R951.)

Случаи гетерохронии достаточно часты в эволюции позвоночных (McNamara, 2012). Выше уже был упомянут увеличенный период роста человеческого мозга. Еще один пример мы находим у сумчатых, чьи челюсти и передние конечности развиваются быстрее, чем у плацентарных млекопитающих, что позволяет их новорожденным вскарабкаться в сумку матери и добираться там до молочной железы (Smith, 2003; Sears, 2004). Полагают, что птицы возникли отчасти в результате гетерохронного роста черепов и трубчатых костей динозавров (Bhullar et al., 2012; McNamara and Long, 2012). Огромное число позвонков и ребер образуется у эмбрионов змей (более 500 у некоторых видов) также вследствие гетерохронии. Специфичные для змей перестройки хроматина способствуют намного более длительной экспрессии фактора транскрипции Oct4 в мезодерме сомитов, чем у других позвоночных (Aires et al., 2016). Кроме того, соотношение цикла реакций сегментации к скорости роста тканей в эмбрионе змеи почти вчетверо быстрее, чем у близких к ним эмбрионов позвоночных (Gomez et al., 2008). Удлиненные пальцы в плавниках дельфина, вероятно, тоже являются результатом продленной гетерохронной экспрессии *Fgf8*, который, как было показано в гл. 19, кодирует главный паракринный фактор роста конечностей (Richardson and Oelschläger, 2002; Cooper, 2010).

Гетерохронии ответственны за бесчисленное множество форм цветов даже в близкородственных группах (Li and Johnston, 2000; Buendia-Monreal and Gillmor, 2018). Например, цветы опыляемого колибри вида *Delphinium* отличаются от более распространенного опыляемого пчелами вида вследствие общего снижения скорости роста, связанного с увеличенным периодом роста лепестков, обеспечивающих поддержку цветка (Guerrant, 1982). Различия в развитии цветка семейства Solanaceae (картофель, паслен, петуния и перец) часто образуются вследствие гетерохронных сдвигов в формировании лепестков (Kostyun and Moyle, 2017).

Гетерометрия

Гетерометрия — это изменение количества продукта гена или структуры. О гетерометрических изменениях уже упоминалось в гл. 16, когда рассматривали эволюцию слепого мексиканского аноптихта (пещерной рыбы; см. рис. 16.10). В этом случае избыточная продукция белка Sonic hedgehog (*Shh*) по срединной линии прехордальной пластинки подавляет ген *Pax6*, что предупреждает формирование глаз. Однако избыточная экспрессия *Shh* имеет и иные последствия. Она вызывает не только дегенерацию глаз, но и уве-

личение челюстей и числа вкусовых сосочков (Franz-Odenaal and Hall, 2006; Yamamoto et al., 2009). Обитание пещерных рыб в полной темноте позволяет отбору увеличить размер их челюстей и вкусовую чувствительность за счет зрения.

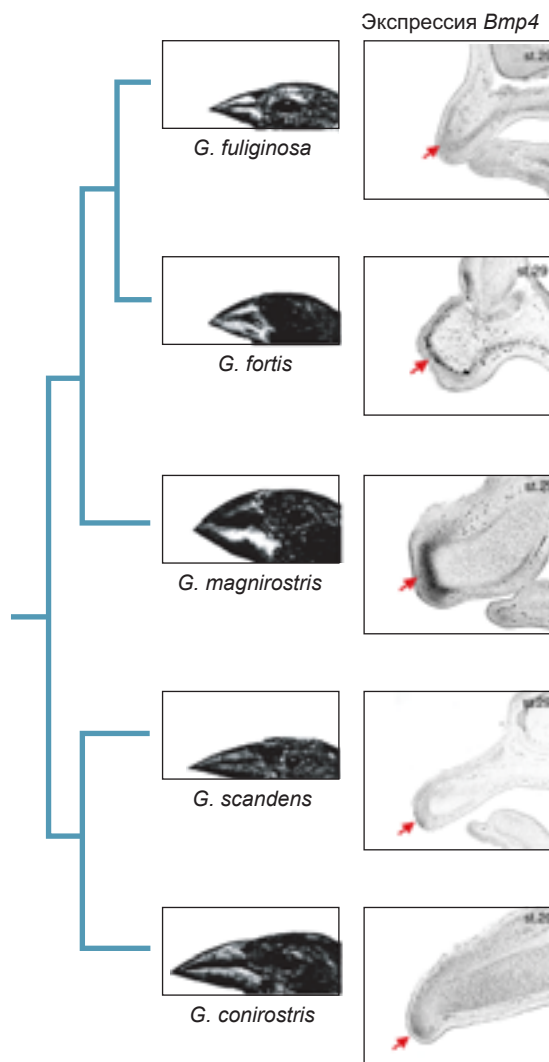
Гетерометрию можно также заметить в спецификации органов цветка. У некоторых видов двудомных покрытосеменных (имеющих отдельные мужские и женские растения) подавление генов типа цветковых органов классов В или С может определять пол цветка. Например, в мужских растениях шпината гены типа цветковых органов класса В экспрессируются в большом количестве в третьем круге цветка, образуя пыльники. Гены класса В очень слабо экспрессируются в женских растениях, у которых пыльники отсутствуют (Pfent et al., 2005). Таким образом, у некоторых видов растений пол может зависеть от уровня экспрессии генов типа цветковых органов.

ДАРВИНОВЫ ВЬЮРКИ

Один из наиболее известных примеров гетерометрии — это прославленные Дарвином вьюрки, группа из 15 близкородственных видов птиц, собранных Чарльзом Дарвином и его спутниками в знаменитом морском путешествии во время захода на Галапагосские и Кокосовые острова в 1835 г. Эти птицы помогли Дарвину сформировать основу его эволюционной теории происхождения видов в результате изменчивости и до сих пор служат одним из лучших примеров адаптивной радиации и естественного отбора (Weiner, 1994; Grant and Grant, 2008). Систематики показали, что эти виды вьюрков развились особым образом, в котором основным событием видообразования стала дивергенция между кактусовыми и наземными вьюрками. Наземные вьюрки развили мощный широкий клюв, который дает им возможность расклеивать семена, тогда как кактусовые вьюрки развили узкие заостренные клювы, позволяющие исследовать цветы кактуса и фрукты в поисках насекомых и частей цветка. Показано, что различия в форме клюва вызваны изменениями в росте мезенхимы, происходящей из нервного гребня, в лобноносовом отростке (т. е. в клетках, которые образуют кости лица) (Schneider and Helms 2003); обнаружена замечательная корреляция между формой клюва вьюрка, временем и величиной экспрессии *Bmp4* (рис. 24.9) (Abzhanov et al., 2004). Больше ни один из паракринных факторов не проявляет таких различий. Экспрессия *Bmp4* у наземных вьюрков начинается раньше и намного более выражена, чем экспрессия *Bmp4* у кактусовых вьюрков. Во всех случаях паттерн экспрессии *Bmp4* коррелирует с шириной и мощностью клюва.

Важность различий экспрессии была подтверждена экспериментально путем изменения паттерна

экспрессии *Bmp4* в курином зародыше, чтобы имитировать гетерометрические и гетерохронные изменения у наземных вьюрков (Abzhanov et al., 2004; Wu et al., 2004). Когда экспрессия *Bmp4* в мезенхиме лобноносового отростка была увеличена, у цыпленка развивался широкий клюв, напоминающий клюв наземного вьюрка. Напротив, когда сигнализацию



Из: A. Abzhanov et al., 2004.
Science 305: 1462–1465

Рис. 24.9. Корреляция между формой клюва и экспрессией *Bmp4* у пяти видов дарвиновых вьюрков. В роде *Geospiza* наземные вьюрки (представленные *G. fuliginosa*, *G. fortis* и *G. magnirostris*) дивергировали от кактусовых вьюрков (представленных *G. scandens* и *G. conirostris*). Различия в морфологии клюва коррелируют с гетерохронными и гетерометрическими изменениями экспрессии *Bmp4* в клюве. *BMP4* (красная стрелка) экспрессируется раньше и на более высоком уровне у питающихся зернами наземных вьюрков. Фотографии клювов эмбрионов сделаны на одной и той же стадии развития (стадия 29). Различие экспрессии гена предоставляет одно из объяснений роли естественного отбора у этих птиц

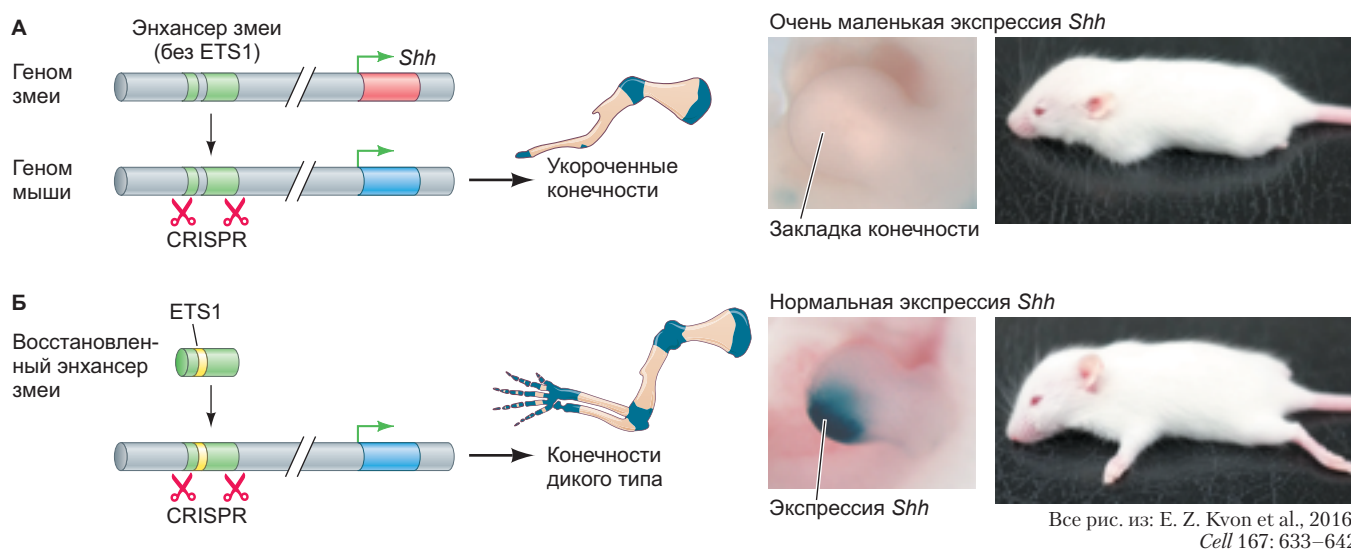


Рис. 24.10. А. Энхансер *Shh* конечностей змеи утратил элемент (ETS1), который является критическим для управления развитием конечностей. Когда энхансер *Shh* змеи замещает энхансер *Shh* мыши в эмбрионе мыши, *Shh* (синяя окраска) очень слабо заметен в зачатке конечности и мышь развивается с укороченными конечностями. Б. Если утраченный сайт ETS1 энхансера *Shh* мыши (или другой энхансер *Shh* рептилий) вводить в энхансер змеи, он функционирует нормально, управляя экспрессией *Shh* мыши в закладках конечностей и формируя конечности полного размера

ВМР ингибировали в этой области (воздействием ингибитора ВМР *Noggin*), клюв утрачивал мощность и ширину¹.

Однако история продолжается. Применение технологий генных чипов показало, что уровень экспрессии еще одного гена *Calmodulin* в 15 раз выше в клювах эмбрионов ширококлювых кактусовых выюрков, чем у остроклювых наземных выюрков. Более того, при регуляции, повышающей уровень *Calmodulin* в клюве куриного эмбриона, клюв тоже становится длинным и заостренным. ВМР4 и *Calmodulin*, следовательно, представляют собой две мишени для естественного отбора, одна из которых регулирует ширину и мощность клюва, а другая — его длину. Вместе они могут объяснить вариации форм клюва у дарвиновых выюрков (Abzhanov et al., 2006; Campàs et al., 2011).

ЗМЕИНЫЕ НОГИ

Как получилось, что змеи утратили свои конечности? На самом деле у эмбриона питона сначала образуются первые части временных конечностей. Однако участок, формирующий конечность (АЕР; см. гл. 19), оказывается не способен сохраниться вследствие слабой продукции *Sonic hedgehog* (*Shh*), что, в свою очередь, происходит в результате делеции в дистальном энхансере гена *Shh*. Этот делетированный участок содержал сайты связывания важных факторов транскрипции, включая белки Нох. Поэтому энхан-

сер змеи не в состоянии ответить на белки Нох, поскольку белки Нох не могут с ними связаться. Если энхансером змеи заместить нормальный энхансер в эмбрионе мыши, у нее разовьются резко укороченные конечности (рис. 24.10А; Kvon et al., 2016; Leal and Cohn, 2016; 2018). Нормальный фенотип восстанавливается, если отсутствующий сайт связывания фактора транскрипции добавить в энхансер змеи (рис. 24.10Б).

Гетеротипия

При гетерохронии, гетеротипии и гетерометрии мутации влияют на регуляторные участки гена. Изменения **гетеротипии** воздействуют на кодирующий участок гена и таким образом изменяют функциональные свойства синтезируемого белка. Изменения в кодирующей последовательности факторов транскрипции могут иметь значительные последствия в эволюции животных и растений (Wang et al., 2005).

¹ Следует отметить важный принцип: паракринные факторы и факторы транскрипции выполняют разные функции в разных типах клеток в зависимости от других белков. ВМР может вызывать апоптоз в межпальцевых участках, в митозе лицевой мезенхимы, формировании кости в ребрах и эпидермальной спецификации в эктодерме.

ПОЧЕМУ У НАСЕКОМЫХ ШЕСТЬ НОГ

У насекомых только шесть ног, хотя у большинства других групп членистоногих (вспомним о пауках, многоножках, сороконожках, омахах и креветках) намного больше. Как получилось, что у насекомых ноги образуются только в трех грудных сегментах, а на сегментах брюшка нет? Ответ, похоже, кроется во взаимоотношениях между белком *Ultrabithorax* (*Ubx*) и геном *Distal-less*. У большинства групп членистоногих *Ubx* не ингибирует *Distal-less*. Однако в линии насекомых присутствует мутация, в которой группа нуклеотидов в гене *Ubx* замещена последовательностью, кодирующей ряд остатков аланина (рис. 24.11; Galant and Carroll, 2002; Ronshaugen et al., 2002). Этот полиаланиновый участок подавляет транскрипцию *Distal-less* в абдоминальных сегментах.

Если ген *Ubx* артемии экспериментально модифицировать так, чтобы он кодировал у насекомых полиаланиновый участок, эмбрион артемии подавляет ген *Distal-less*. Способность *Ubx* ингибировать *Distal-less*, похоже, является результатом мутации с приобретением новой функции, которая характерна для линии насекомых.

КУКУРУЗА: ПОЧЕМУ ЕЕ ТАК ЛЕГКО ЕСТЬ

На распространение по миру кукурузы (*Zea mays*) повлияла мутация фактора транскрипции (Wang et al., 2005). Считается, что между предковым растением теосинтом мексиканским и современной кукурузой существовало множество переходных форм, и одной из наиболее экономически важных стадий

стало высвобождение зерна из твердой защитной оболочки (половы). Такое изменение собрало зерна в початок, что сделало сбор кукурузы для потребления человеком более легким. Это критически важное событие в эволюции и окультуривании кукурузы контролировал единственный ген *teosinte glume architecture* (*tga1*), который кодирует фактор транскрипции, активный в развитии соцветий (початка) у растения. Мутация в *tga1* приводит к замене единственной аминокислоты — лизина у теосинта на аспарагин в кукурузе. Изменение, видимо, вызывает более быструю деградацию белка Tga1, что предупреждает завершение формирования оболочки зерна, которая обычно его покрывает. Когда *tga1* кукурузы помещают в теосинт, зерна последнего становятся похожими на кукурузные; а когда *tga1* теосинта экспрессируется в кукурузе, ее зерна становятся похожими на зерна теосинта.

Ограничения, накладываемые развитием на эволюцию

Существует всего около трех дюжин основных видов животных, которые охватывают все планы строения организмов, известные в животном царстве. Любой может легко вообразить иной план строения, представив себе несуществующее животное. Авторы научной фантастики этим занимаются постоянно. Так почему же мы не видим других планов строения организмов среди существующих животных? Чтобы ответить на этот вопрос, надо рассмотреть ограничения, накладываемые на эволюцию. Само понятие ограни-



Рис. 24.11. Изменения связанного с кладой насекомых белка *Ubx* в эволюции членистоногих. Из всех членистоногих только насекомые имеют белок *Ubx*, который способен репрессировать экспрессию гена *Distal-less* и таким образом ингибировать развитие абдоминальных ног. Способность репрессировать *Distal-less* возникла благодаря мутации, которую можно наблюдать только в гене *Ubx* насекомых. (По данным: R. Galant and S. B. Carroll, 2002. *Nature* 415: 910–913, and M. Ronshaugen et al., 2002. *Nature* 415: 914–917.)

чения отдельные группы исследователей используют по-разному. В то время как многие популяционные биологи рассматривают их как ограничения «идеальной» адаптации (например, ограничения оптимального фуражирования), биологи развития рассматривают их как ограничения возможности существования определенных фенотипов (Amundson, 1994; 2005).

Физические ограничения

Законы диффузии, гидравлики и физики неизменны и допускают существование только определенных фенотипов. Например, циркуляция крови невозможна во вращающемся органе; таким образом, позвоночные на колесном ходу (вроде тех, что встретила Дороти в стране Оз) существовать не могут, и все это направление эволюции полностью исключено. Схожим образом структурные параметры и динамика жидкостей исключают существование комаров ростом в полтора метра или шестиметровых пивяков.

Морфогенетические ограничения

Подмечено, что, когда организм отклоняется от пути своего нормального развития, он делает это только ограниченным числом способов (Bateson, 1894; Alberch, 1989). Например, за 300 млн лет накоплено множество вариантов модификации конечностей позвоночных, но часть модификаций не существовала никогда (например, средний палец, более короткий, чем остальные, или предплечье или голень, расположенные более проксимально, чем плечо (бедро); см. гл. 19) (Holder, 1983; Wake and Larson, 1987). Эти наблюдения позволяют предположить, что конструкция конечностей следует определенным правилам (Oster et al., 1988; Newman and Müller, 2005).

Один из главных источников морфогенетических ограничений лежит в ограниченном числе путей, которыми дифференцированные паттерны могут возникнуть из гомогенности. Основной среди механизмов формирования паттернов — **реакционно-диффузионный механизм**. Он был сформулирован Аланом Тьюрингом (Turing, 1952) и представляет собой путь формирования сложных химических структур из веществ, которые исходно распределены равномерно. Согласно объяснениям Тьюринга, такое формирование паттерна может быть достигнуто двумя равномерно распределенными веществами, если скорость продукции каждого из них зависит от другого, а скорости их диффузии различаются. Образующаяся таким путем структура стабильна и может быть основой для движущей силы изменений в развитии. Мы уже видели, как невероятно полезно это было для объяснения развития и возможных путей эволюции конечностей позвоночных в гл. 19 (см. рис. 19.15). Модель Тьюринга использовали для объ-

яснения формирования конечностей и пальцев четвероногих, как полос у зебр и рыбы-ангела, а также формирования жевательных бугорков зуба.

Плейотропные ограничения и избыточность

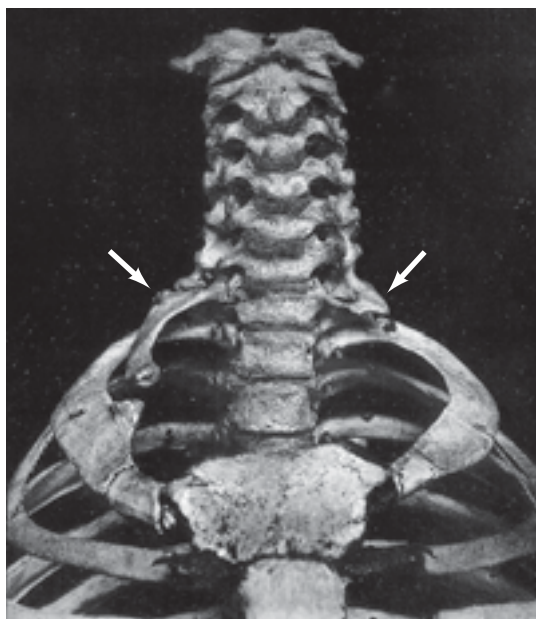
Плейотропия — способность гена играть различные роли в клетках — противоположна модульности и связана с взаимодействием разных частей организма, а не их независимостью (Lonfat et al., 2014; Hu et al., 2017). Плейотропия может лежать в основе ограничений, наблюдаемых в развитии млекопитающих. Предполагается, что млекопитающие имеют только семь шейных позвонков (тогда как птицы могут иметь их дюжины), поскольку гены *Нох*, которые их специфицируют, связаны с пролиферацией стволовых клеток у млекопитающих (Galis, 1999; Galis and Metz, 2001; Abramovich et al., 2005; Schiedlmeier et al., 2007). Таким образом, изменения экспрессии гена *Нох*, которые могут облегчить эволюционные изменения скелета, должны также *регулировать* клеточную пролиферацию и приводить к онкологическим заболеваниям. Галис подкрепил свое предположение эпидемиологическим примером, показывающим, что изменения в морфологии скелета коррелируют с онкологическими заболеваниями детского возраста. Внутриматриональный отбор, направленный на то, чтобы формировалось не больше и не меньше семи шейных ребер, по-видимому, весьма жесток. По меньшей мере 78% человеческих эмбрионов с избыточным передним ребром (т. е. с шестью шейными позвонками) погибают до рождения, а 83% — на первом году жизни. Эти смерти, видимо, вызваны множественными врожденными аномалиями или онкологическими заболеваниями (рис. 24.12); Galis et al., 2006).

Другие ограничения связаны с избыточностью. В этих случаях два или более гена могут давать одинаковый эффект; если один из генов функционирует неправильно, другой делает за него его работу. У насекомых и млекопитающих многочисленные энхансеры обеспечивают стойкие паттерны экспрессии генов, делая фенотип стабильным (Osterwalder et al., 2018).

Экологическая эволюционная биология развития

Сценарий развития организма записан не только в генах. Инструкции развития вносит и окружающая среда, особенно симбиотические микробы. Исследование взаимоотношений между развивающимся организмом и окружающей средой создало область экологической биологии развития. Если эволюционные изменения обусловлены наследуемыми изменения-

А



Из: A. Fischel. 1906. *Anatomische Hefte* 31: 462–588.
обработано J. B. Obernetter

Б

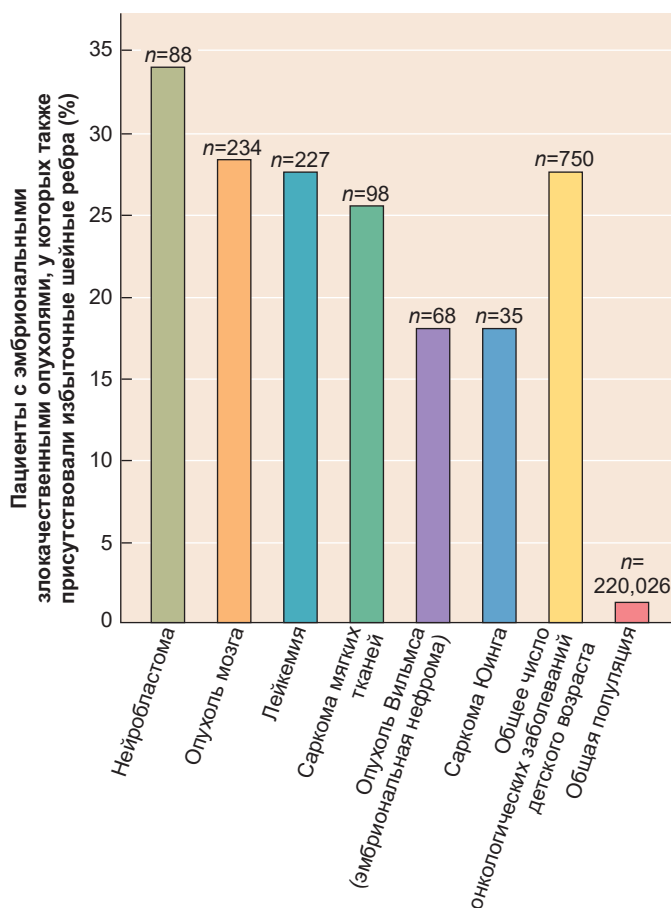


Рис. 24.12. А. Скелет с избыточным шейным ребром (показано стрелками). Б. Около 80% плодов с избыточным шейным ребром погибают до рождения. У выживших часто развиваются онкологические заболевания на очень ранних этапах жизни, что демонстрирует очень сильное давление отбора против изменений в числе шейных ребер у млекопитающих. (Рис. Б по данным: R. Schumacher et al., 1992. *Eur J Pediatrics* 151: 432–434.)

ми развития, а развитие вовлекает взаимодействия с факторами окружающей среды, тогда изменения во взаимодействиях со средой в ходе развития могут влиять на эволюцию. Как писал Армин Мочек (Mozek, 2015), развиваться — значит взаимодействовать с окружающей средой, эволюционировать — значит изменять эти взаимодействия наследуемым образом. Эта идея дала начало отрасли эволюционной биологии развития, именуемой **экологической эволюционной биологией развития** или **есо-evo-devo** (Abouheif et al., 2014; Gilbert and Epel, 2015; Sultan, 2015; 2017)¹. Рассмотрим три главных аспекта есо-

evo-devo: пластичность развития, наследование эпигенетических аллелей и симбиоз развития.

Пластичность — первая эволюция

В начале 1900-х гг. некоторые биологи-эволюционисты предполагали, что среда может способствовать отбору одного из множества индуцированных средой фенотипов и что этот фенотип становится затем генетически «закрепленным» и нормальным для данного вида. Одна из наиболее важных гипотез первичной пластичности включает в себя концепцию **генетической ассимиляции**, определяемой как процесс, благодаря которому фенотипическая характеристика, первоначально образованная только лишь в ответ на некое влияние окружающей среды, оказывается благодаря процессу отбора воспринятой

¹ Экологическая эволюционная биология развития (есо-evo-devo) и экологическая биология развития (есо-devo) — перекрывающиеся, но все же различные дисциплины. Первая использует принципы есо-devo для объяснения эволюции. Вторая рассматривает взаимоотношения между развитием и средой, но не обязательно затрагивает эволюционный аспект.

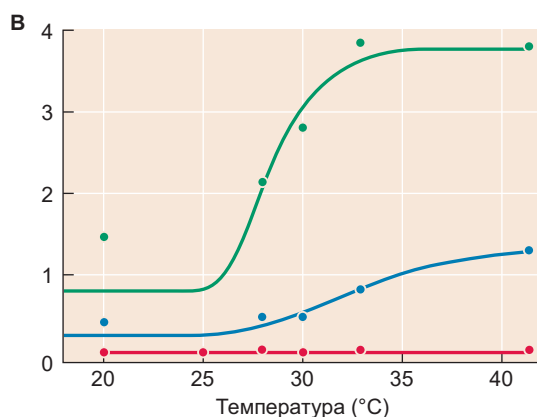
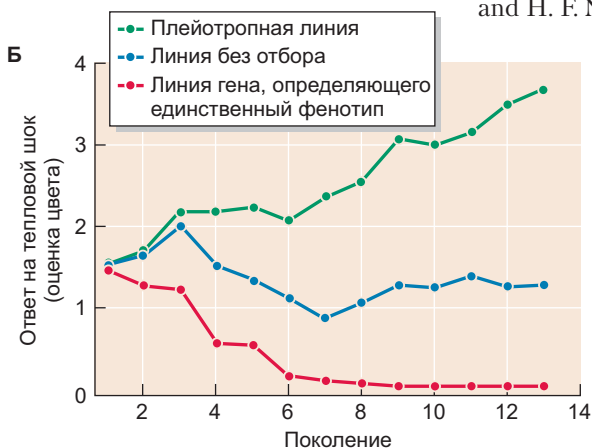


Рис. 24.13. Эффект отбора на опосредованное температурой изменение окраса личинки у черного мутанта табачного бражника *Manduca sexta*. **А.** Две цветовых морфы личинок *Manduca sexta*. **Б.** Изменение окраса у подвергшейся тепловому шоку личинки в ответ на отбор. Одну группу отбирали на усиление зеленого окраса после тепловой обработки (плейотропный ген; *зеленая линия*), причем для получения следующего поколения отбирали самые зеленые личинки. Еще одну группу отбирали на уменьшение изменения окраса (т. е. остающиеся черными) после тепловой обработки (ген, определяющий единственный фенотип; *красная линия*). Оставшиеся личинки не отбирали (*голубая линия*). Цветовая оценка (0 — для полностью черных, 4 — для полностью зеленых) показывает относительное число окрашенных участков в личинке. Линия, в которой ген определяет единственный фенотип, утратила пластичность после седьмого поколения. **В.** Норма реакции для 13-го поколения, содержавшегося при постоянных температурах между 20 и 33 °C и получавшего тепловой шок при 42 °C. Отметим резкий рост плейотропии при температуре около 28 °C. (По данным: Y. Suzuki and H. F. Nijhout, 2006. *Science* 311: 650–652.)

генотипом, так что соответствующий фенотип формируется даже в отсутствие влияния окружающей среды, которое породило его (King and Stanfield, 1985). Идея генетической ассимиляции была введена независимо Уоддингтоном (Waddington, 1942, 1953, 1961) и Шмальгаузен (Schmalhausen, 1949) для объяснения удивительных результатов экспериментов по искусственному отбору, в которых фенотипы, индуцированные окружающей средой, экспрессировались даже в отсутствие внешних стимулов, которые первоначально были необходимы, чтобы породить их.

Генетическая ассимиляция в лабораторных условиях

Генетическую ассимиляцию легко продемонстрировать в лаборатории. Судзуки и Нийхоут (Suzuki and Nijhout, 2006) показали генетическую ассимиляцию в личинках бабочки табачного бражника *Manduca sexta* (рис. 24.13). С помощью рациональных протоколов отбора эти исследователи сумели вывести линии, в которых отбор шел в пользу фенотипа, индуцированного средой (цвет личинки), и который в конце концов был получен без воздействия фактора окружающей среды (температурного шока).

Лежащие в основе этого эффекта генетические различия касались способности теплового стресса повышать титр ювенильного гормона в личинке. Так, по крайней мере в лабораторных условиях, может быть показана работоспособность генетической ассимиляции.

Одной из наиболее известных лабораторных демонстраций генетической ассимиляции были эксперименты Уоддингтона с использованием лабораторных линий *Drosophila*, которые имеют специфическую норму реакции на эфир. Эмбрионы, подвергшиеся воздействию эфира на определенной стадии, развивали фенотип, схожий с таковым при мутации *bithorax*, и имели четыре крыла вместо двух. Балансирующие структуры мушки — жужжальца на третьем грудном сегменте трансформировались в крылья (см. гл. 9). Поколение за поколением обрабатывали эфиром и селективно скрещивали каждый раз особи с четырьмя крыльями. После 20 поколений при скрещивании *Drosophila* давали мутантный фенотип, даже когда эфир не применяли (рис. 24.14; Waddington, 1953, 1956).

В 1996 г. Гибсон и Хогнес повторили эксперименты Уоддингтона с *bithorax* и получили схожие результаты. Более того, они обнаружили четыре разных аллеля гена *Ultrabithorax* (*Ubx*), существовавшие в популяции до воздействия эфира. *Ubx* — это гоме-

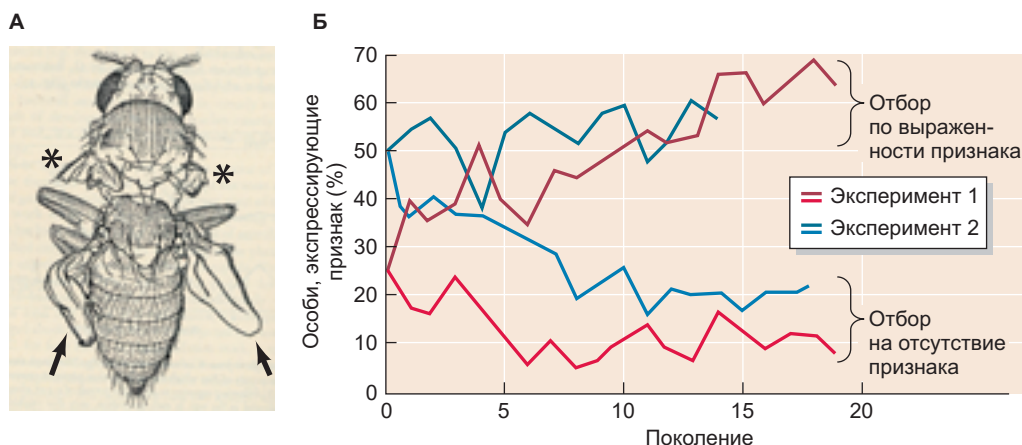


Рис. 24.14. Фенокопия мутации *bithorax*. **А.** Фенотип *bithorax* (четырёхкрылый) получен обработкой эмбриона эфи́ром. Передние крылья удалены, чтобы показать аномальный метаторакс. Звездочкой обозначены культы передних крыльев, стрелками — добавочная пара крыльев. Данная особь взята из «ассимилированной» линии, которая продуцирует такой фенотип без обработки эфи́ром. **Б.** Эксперименты по отбору на *bithorax*-подобный ответ на обработку эфи́ром или против него. Показаны два эксперимента (красная и голубая линии). В обоих случаях одну из групп отбирали на наличие генетического признака, а другую — на его отсутствие. (По данным: С. Н. Waddington, 1956. *Evolution* 10: 1–13.)

озисный ген, чьи мутации с утратой функции ответственны за генетически наследуемый четырёхкрылый фенотип мушки (см. рис. 9.25). Гибсон заключил: «В нашем эксперименте показано, что различие в гене *Ubx* служит причиной этих морфологических изменений». Однако каким образом эфи́р вызывает такие изменения, было неизвестно.

Вероятно, ответ кроется в наборе белков, именуемых **белками теплового шока**, таких как Hsp90. Hsp90 — это молекулярный шаперон, который требуется для поддержания множества белков в их правильной трехмерной конформации. Существуют многочисленные генетические мутации, которые обычно не экспрессируются как мутантные фенотипы, поскольку Hsp90 может корректировать небольшие изменения в структуре мутантного белка. Однако, если применяли тепловой шок или эфи́р, возникало очень много других белков, «требующих внимания» со стороны Hsp90, и его «не хватало на всех». Таким образом, некоторые существующие варианты экспрессировались позже обычного. Hsp90, вероятно, является как бы «конденсатором» эволюционных изменений, позволяющим генетическим изменениям аккумулироваться до тех пор, пока стресс со стороны окружающей среды не высвободит их и не даст возможность оказать их эффект на фенотип. Когда изменения в окружающей среде и их комбинации проявляются, можно предсказать, что большинство из них окажется либо нейтральными, либо вредными. Однако некоторые из них оказываются полезными и отбираются новыми условиями окружающей среды. Продолжительный отбор делает возможным генетическое закрепление адаптивного физиологиче-

ского ответа (Rutherford and Lindquist, 1998; Queitsch et al., 2002). Обнаружено, что Hsp90 «забуферивает» генетические вариации растений и позвоночных (Sangster et al., 2008; Rohner et al., 2014). Сангстер с сотрудниками заключили, что Hsp90, вероятно, дополняет концепцию буфера развития Уоддингтона или механизма молекулярного канализирования, который может приводить к ассимиляции новых черт в широком масштабе.

Генетическая ассимиляция в природной среде

Известно несколько примеров, в которых, вероятно, фенотипические вариации, возникшие благодаря пластичности развития, позже закрепляются в генах. Первый из них касается вариаций пигмента у бабочек (Hiyama et al., 2012). Еще в 1890-х гг. исследователи использовали тепловой шок для нарушения характера пигментации крыла бабочки (Standfuss, 1896; Goldschmidt 1938). В некоторых случаях цветовые узоры, которые развиваются после температурного шока, имитируют нормальные генетически контролируемые узоры подвидов (эко-типов), живущих при других температурах. Дальнейшие наблюдения за многочисленными видами бабочек подтвердили, что температурные вариации могут индуцировать фенотипы, которые имитируют генетически контролируемые структуры родственных рас или видов, обитающих в более холодных или более теплых условиях (Shapiro, 1976; Nijhout, 1984; Otaki et al., 2010).

У рыб, амфибий и рептилий индуцированные факторами окружающей среды фенотипы челюстей, вероятно, способны быть ассимилированы. Существуют виды лягушек, у которых индуцированный средой хищный фенотип у одного из видов представляет собой генетически переданный фенотип близкородственного вида (Levis and Pfennig, 2018; Levis et al., 2018). Рыбка цихлида тоже демонстрирует удивительно разнообразные структуры челюстей в зависимости от диеты. Полагают, что у лягушек (как и у бабочек) генетическая ассимиляция происходит благодаря новоприобретенной гормональной регуляции, участвующей в метаморфозе. Более крупные челюсти цихлид, вероятно, индуцирует среда путем физического стресса, активирующего сигнальный путь Wnt формирования кости. В настоящее время, однако, некоторые виды активируют путь Wnt без внешних стимулов (Parsons et al., 2014; Hu and Albertson, 2017).

Еще один яркий пример генетической ассимиляции связан с тигровой змеей (*Notechis scutatus*), структура головы которой изменяется под действием диеты. У тигровой змеи может развиваться более крупная голова, позволяющая пожирать более крупную добычу. Эта пластичность заметна, когда диета змеи включает и крупных, и мелких мышей. Однако на некоторых островах обитают только крупные мыши, и там рождаются змеи с крупными головами, и пластичность отсутствует. Это чистое эмпирическое доказательство генетической ассимиляции, с развитием смещения адаптивных признаков от фенотипически пластичной экспрессии через канализирование в течение нескольких тысяч лет (Aubret and Shine, 2009). Таким образом, индуцированный *средой* фенотип мог стать обычным *генетически* индуцируемым в одной из частей такого организма.

Существует, по меньшей мере, два важных эволюционных преимущества фиксации индуцированных средой фенотипов (West-Eberhard, 1989; 2003). Во-первых, *фенотип не является случайным*. Среда вызывает формирование нового фенотипа, а он уже прошел тестирование естественным отбором. Это должно устранять длительный период тестирования фенотипов, возникающих вследствие случайных мутаций. Хотя мутации и случайны, параметры развития могут отвечать за некоторые направления морфологической эволюции (Garson et al., 2003).

Второе преимущество в том, что *фенотип уже существует в значительной части популяции*. Одна из проблем объяснения новых фенотипов состоит в том, что их носители выглядят «монстрами» по сравнению с диким типом. Как могли такие мутации, вероятно, присутствующие только у одного индивида или в одном семействе, в конце концов стабилизироваться и охватить всю популяцию? Модель, основанная на развитии, решает эту проблему:

данный фенотип присутствовал в течение длительного времени, и способность экспрессироваться широко распространена в популяции; он просто нуждается в том, чтобы быть генетически стабилизированным генами-модификаторами, которые уже существуют в популяции.

Принимая во внимание эти два серьезных преимущества, генетическая ассимиляция морфы, исходно возникшей в результате пластичности развития, может вносить существенный вклад в возникновение нового вида. Эколог Мэри Джейн Вест-Эберхард (West-Eberhard, 2005) отметила, что вопреки расхожему мнению, «новеллы», инициированные средой, могут иметь более значительный эволюционный потенциал, чем индуцированные мутациями.

Отбираемые эпигенетические вариации

Изменения развития предоставляют исходный материал для вариаций. Однако сигналы в развитии могут поступать из окружающей среды, так же как из ядра и цитоплазмы. Хотя утверждение звучит поламаркистски, оно не имеет ничего общего с идеей Ламарка, согласно которой, фенотип, приобретенный путем упражнения или неупражнения, может передаваться в клетки герминативной линии. Тянущийся за листьями к верхушкам деревьев жираф не делает шею своих отпрысков длиннее, дети тяжелоатлетов не наследуют физических качеств своих родителей, а случайные жертвы несчастных случаев, которые потеряли в них конечности, могут быть спокойны: их дети родятся с нормальными руками и ногами. В этих примерах ДНК герминативных клеток не изменялась вариациями, индуцированными средой, и признаки не передавались из поколения в поколение.

Однако что будет, если фактор среды вызовет изменения не только в соматической ДНК, но и в ДНК герминативных клеток? Тогда эффект может перейти следующему поколению. Это произойдет не вследствие генетических изменений в хроматине, а из-за эпигенетических изменений.

Тогда как аллели являются вариантами последовательностей ДНК, способных передаваться из поколения в поколение, **эпиа́ллели** — варианты структуры хроматина, которые также могут наследоваться. В большинстве известных случаев эпиа́ллели представляют собой различия паттернов метилирования ДНК, которые способны влиять на клетки зародышевой линии и таким образом передаваться потомству. Асимметричный вариант *peloria* растения льнянка (*Linaria vulgaris*; **рис. 24.15**) впервые был описан Линнеем в 1742 г. как стабильно наследуемая форма. В 1999 г. Коэн показал, что этот вариант возник бла-

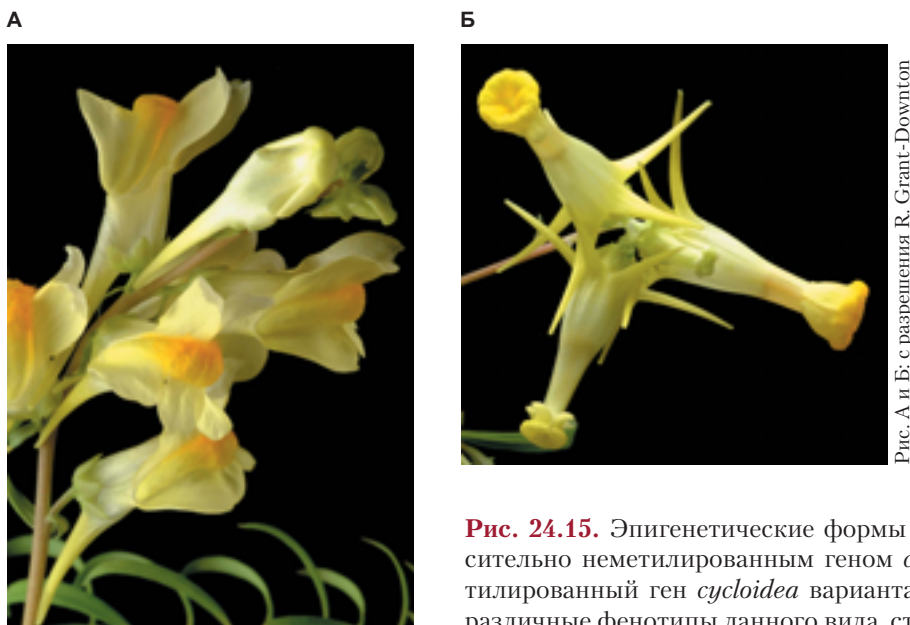


Рис. А и Б: с разрешения R. Grant-Downton

Рис. 24.15. Эпигенетические формы льнянки. **А.** Типичная *Linaria* с относительно неметилированным геном *cycloidea*. **Б.** Сравнительно сильно метилированный ген *cycloidea* варианта *peloria*. Эпиаλληели, которые создают различные фенотипы данного вида, стабильно наследуются

годаря не специфической аллели, а стабильной эпиаλληели. Вместо мутации в гене *CYCLOIDEA* формы *peloria* произошло гиперметилирование. Для развивающейся системы не важно, был ген инактивирован вследствие мутации или изменения конфигурации хроматина (Cubas and Coen, 1999), — эффект один и тот же.

Существует множество примеров эпиаλληельного наследования (Jablonka and Raz, 2009; Gilbert and Epel, 2015):

- **Метилирование ДНК, индуцированное диетой.** У фенотипа *viable-Agouti* мыши различия метилирования влияют на цвет шкуры и полноту. Когда беременных самок держат на диете с высоким содержанием доноров метильных групп, специфический паттерн метилирования в локусе *Agouti* передается не только потомству, развивающемуся внутриутробно, но и его потомству и потомству следующего поколения (Jirtle and Skinner, 2007). Схожим образом ферментативные и метаболические фенотипы можно сформировать у крыс внутриутробно диетой, ограниченной в белке. Тогда ограничения в белке в ходе беременности бабушки приводят к специфическому паттерну метилирования у ее детенышей и внуков (Burdge et al., 2007; Lillycrop and Burdge, 2015).

- **Метилирование ДНК, индуцируемое веществом, нарушающим эндокринную систему.** Нарушающее эндокринную систему вещество винклозолин (фунгицид, используемый при выращивании зерновых), метоксихлор (инсектицид) и бисфенол А (используемый в производстве пластмассы) способны менять характер метилирования ДНК в герминативной линии, вызывая таким образом аномалии развития и предрасположенность к заболеваниям у внучатого поколения мышей, подвергшихся внутриутробному воздействию этих хи-

мических веществ (см. рис. 23.14; Anway et al., 2005, 2006a, b; Newbold et al., 2006; Gillette et al., 2018; Mennigen et al., 2018).

- **Метилирование ДНК, индуцированное поведением и различиями в микроРНК.** Показано, что стрессоустойчивое поведение крыс связано с характером метилирования генов глюкокортикоидных рецепторов, индуцированных материнской заботой. Обнаружено, что крысы, которые получали значительную материнскую заботу, в меньшей степени проявляли вызванную стрессом тревогу и, если это были самки, становились матерями, которые давали своему потомству схожий уровень материнской заботы (Meaneу, 2001). Предполагается, что индуцированное средой поведение может передаваться по наследству с помощью микроРНК спермы (Garr et al., 2014; Rodgers et al., 2015).

- **Различия метилирования ДНК, индуцированные освещенностью.** На морфологию стебля и листьев гречихи *Polygonum* влияют условия освещенности, в которых находились родительские особи этого растения. Такие измененные фенотипы передаются эпиаλληелями, имеющими разные паттерны метилирования (Baker et al., 2018).

Таким образом, эпигенетические вариации ДНК дают возможность факторам среды влиять на наследуемые фенотипы путем, отличным от мутаций ДНК.



Загадки развития

Недавние достижения позволяют предполагать, что симбионты могут играть центральную роль в эволюционных событиях. Каким образом бактерии могли быть вовлечены в репродуктивную изоляцию и в происхождение многоклеточных животных?

Эволюция и симбиоз развития

Один из важных аспектов развития связан с **симпоэзом** — взаимодействиями в развитии с ожидаемой популяцией симбионтов. Существует три основных пути эволюции через изменения симпоэза.

Во-первых, симбионты могут быть источником селектируемых вариаций. Симбионты могут передаваться прямо или косвенно от родителей к потомству через мать и, таким образом, образовывать отдельный источник наследственности (Funkhauser and Bordenstein, 2013; Roughgarden et al., 2018). Например, тля гороховая (*Acyrtosiphon pisum*) содержит многочисленные симбиотические виды, живущие в ее клетках. Один из видов симбиотических бактерий *Buchnera aphidicola* может обеспечить тлю либо более высокую плодовитость, либо большую устойчивость к температуре в зависимости от того, какую аллель белка теплового шока продуцирует бактерия. Другая симбиотическая бактерия вида *Rickettsiella* содержит аллели, способные изменять окрас тли (**рис. 24.16**). Третий бактериальный симбионт *Hamiltonella defensa* способен (если он принадлежит к соответствующему штамму) предоставить белок, который защитит тлю-хозяина от паразитических ос (Dunbar et al., 2007; Oliver et al., 2009;

Tsuchida et al., 2010). Полагают, что все эти три симбионта передаются матерью в цитоплазме яйцеклетки или эмбриона и определенные генетически различающиеся штаммы *Buchnera* передались уже миллионам поколений. Таким образом, аллели симбионтов могут изменять развитие и продуцировать новые селектируемые фенотипы.

Во-вторых, взаимоотношения симбионта с хозяином могут быть причиной репродуктивной изоляции. Репродуктивная изоляция, при которой биологические или географические барьеры исключают возможность получения плодового потомства от скрещивания особей одного вида — необходимое условие формирования нового вида, и существует множество способов этого достичь. Бактериальным симбионтам приписывают и презиготические (до оплодотворения) и постзиготические (после оплодотворения) пути репродуктивной изоляции. Примером презиготической репродуктивной изоляции служит бактерия, содержащаяся в пище, потребляемой личинками *Drosophila*, которая влияет на предпочтения взрослой мушки при спаривании. Бактерия изменяет феромоны кутикулы, которые управляют половым выбором (Sharon et al., 2010). Постзиготическая репродуктивная изоляция может возникнуть вследствие цитоплазматической несовместимости.

А Без *Rickettsiella*



4-дневный



8-дневный



12-дневный

Б С *Rickettsiella*



4-дневный

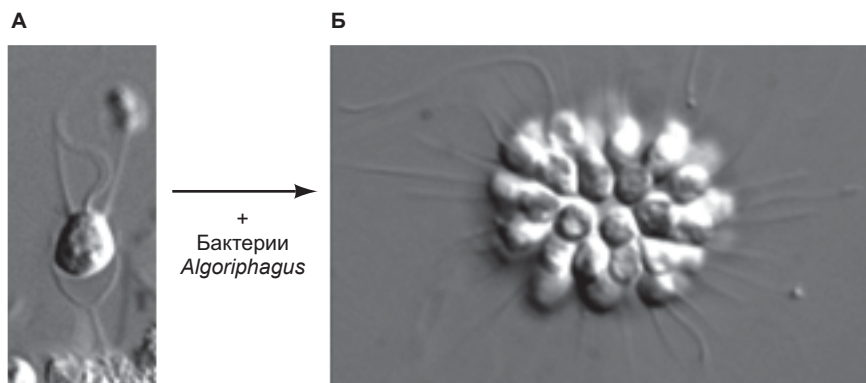


8-дневный



12-дневный

Рис. 24.16. Цвет тли гороховой зависит от того, содержат ли ее клетки бактериальный симбионт *Rickettsiella*. **А.** Без *Rickettsiella* новорожденные гороховые тли красного цвета становятся взрослыми красного окраса. **Б.** При наличии *Rickettsiella* красные новорожденные гороховые тли при взрослении становятся зелеными



Оба рис. из: M. J. Dayel et al., 2011. *Dev Biol* 357: 73–82, любезно предоставлено M. Dayel и N. King

Рис. 24.17. Две морфы простейшего хоанофлагелляты *Salpingoeca rosetta*. **А.** Одноклеточная форма. **Б.** Колониальная форма с множеством клеток, объединенных внеклеточным матриксом. Бактерия *Algoriphagus machipongonensis*, которую часто обнаруживают в *S. rosetta*, может преобразовывать организм из делящегося на отдельные клетки в образующий многоклеточные «розетки»

Бактерии в цитоплазме яйцеклетки одной из групп ос не позволяют яйцеклетке развиваться, если она оплодотворена осой, не имеющей такого симбионта (Brucker and Bordenstein, 2013).

В-третьих, Линн Маргулис и Дорион Саган (Margulis and Sagan, 1993a; 2003) предположили, что симбионты стоят за многими, если не всеми, основными поворотными пунктами эволюции. «Эволюция, — пишут они, — это приобретение новых геномов». Процесс формирования новых организмов путем приобретения симбионтов называют **симбиогенезом** (Merezhkowsky, 1909; Margulis, 1993b), и такие процессы как растительность (Vermeij, 2004), многоклеточность и беременность возникли, как полагают, через симбиозы.

Эволюция многоклеточности

Геномные анализы доказывают, что животные, вероятно, произошли от группы простейших, очень схожих с современными хоанофлагеллятами. Название этих одноклеточных происходит от их сходства с хоаноцитами (воротничковыми клетками) губок. В фильтрованной морской воде одно из таких простейших *Salpingoeca rosetta* пролиферирует бесполым путем, образуя множество одноклеточных простейших. Однако, если культивировать их в среде, содержащей бактерию *Algoriphagus machipongonensis*, клетки не разделяются. Напротив, они образуют листки или розетки, в которых клетки соединены внеклеточным матриксом и цитоплазматическими мостиками (**рис. 24.17**; Dayel et al., 2011; Brunet and King, 2017). Формирование розеток может делать питание более эффективным (Roper et al., 2013). Сфинголипиды в клеточной оболочке бактерий способны влиять на процесс перехода от одноклеточной формы к многоклеточной, а бактерии в природе присутствуют в колониальных формах хоанофлагеллят. Таким образом, многоклеточность могла возникнуть в результате изменений развития, индуцированных соседством с бактериями.

Эволюция плацентарных млекопитающих

Различные типы симбионтов — ретровирусы — могли быть критически важными для формирования матки и плаценты, двух ключевых структур, отличающих плацентарных млекопитающих (и позволяющих эмбриональному развитию происходить внутри организма матери). Белки, происходящие от ретровирусов, позволили сформироваться и функционировать женскому репродуктивному тракту (Dupressoir et al., 2011; Lynch et al., 2011). Активация прогестероном гена пролактина в матке стала возможной благодаря энхансеру, происходящему из ретровируса. Этот энхансер присутствует только у плацентарных млекопитающих, но не у первозверей (яйцекладущих однопроходных, таких как утконос) или сумчатых. Кроме того, эволюция и функционирование плаценты тоже, по-видимому, опосредованы, по крайней мере отчасти, белками, происходящими от ретровирусных генов, которые интегрировались в геномы млекопитающих.

Послесловие

В конце XIX в. экспериментальная эмбриология отделилась от эволюционной и стала развиваться самостоятельно. Однако один из ее пионеров Вильгельм Ру (Wilhelm Roux) предрек, что однажды, когда она созреет, эмбриология вернется к эволюционной биологии, вооруженная мощными механизмами, которые позволят объяснить, как происходила эволюция. Эволюция — это теория изменений, и популяционная генетика может идентифицировать и количественно оценить динамику таких изменений. Ру понял, что эволюционная биология нуждается в теории строения организма, объясняющей, каким образом специфическая мутация проявляет себя в виде селективируемого фенотипа. Креативность эволюции двойственная: развитие — это творчество художника, а естественный отбор — это творчество искусствоведа.

Когда Хьюз и Кауфман (Hughes and Kaufman, 2002) столкнулись с вопросом, как возник план строения членистоногих, они начали свой труд так:

Ответ на этот вопрос ссылкой на естественный отбор правилен, но недостаточен.

Хелицеры многоножек... и клешни омара согласуются с преимуществами приспособляемости этих организмов.

Однако ключ к тайне вот в чем: из каких генетических изменений в развитии эти новообразования возникли впервые?

Это на самом деле тот вопрос, на который современная биология развития получила возможность дать некоторые ответы и продолжает это делать.



С разрешения: R. R. Behringer

О фотографии в начале главы

Как что-то новое приходит в мир? Эволюционные изменения в анатомии происходят вследствие изменений в развитии. Летучие мыши предоставляют нам превосходные примеры характерных анатомических черт, которые могут быть связаны с изменениями экспрессии регуляторных генов развития. В эволюции летающих млекопитающих маленькие изменения экспрессии регуляторных генов развития запускают огромные изменения морфологии передних конечностей. Биологи развития идентифицировали молекулярные изменения, которые критически важны для сохранения перепонки передних конечностей летучих мышей (такие как экспрессия ингибиторов BMP и FGF в перепонках), удлиняющих пальцы и редуцирующих локтевую кость (предплечья) (Sears, 2008; Behringer et al., 2009). Эмбрион очкового листоноса *Carollia perspicillata* на фото демонстрирует перепонки передних конечностей и удлинение пальцев.

24

Коротко Развитие и эволюция

1. Эволюция — результат наследуемых изменений развития. Модификации эмбрионального или личиночного развития могут создавать новые фенотипы, которые затем подвергаются отбору.
2. Гомология означает, что сходство между организмами или генами можно проследить по происхождению от общего предка. В некоторых случаях определенные гены специфицируют одни и те же признаки во всех таксонах животных.
3. Модульность развития позволяет отдельным частям эмбриона изменяться, не влияя при этом на другие его части. Модульность развития в значительной степени обусловлена модульностью энхансеров.
4. Транскрипция нового гена может быть вызвана модификацией существующих элементов ДНК, становящихся энхансерам, мутацией последовательностей ДНК, связанных факторами транскрипции, которые устраняют энхансер, или добавлением энхансерной последовательности, или мутацией уже существующей.
5. Рекрутирование существующих генов и сигнальных путей для реализации новых функций — фундаментальный механизм создания новых фенотипов. Среди таких случаев можно выделить формирование надкрыльев жуков и личиночного скелета морских ежей.
6. Так же как структуры и гены, пути передачи сигнала могут быть гомологичными и включать гомологичные белки, организованные гомологичным образом. Эти пути могут быть использованы в процессах развития и у разных организмов, и в пределах одного и того же организма.
7. Формирование новых типов клеток может быть результатом дуплицирования генов, регуляция которых затем дивергирует. Гены *Nox* и многие другие семейства генов возникли как единственные гены, которые затем дуплицировались.
8. Эволюция может происходить в результате «перешивки» существующих генов. Пути, влияющие на эволюционные изменения в ходе развития на уровне экспрессии генов, следующие: изменение ее места (гетеротопия), изменение ее времени (гетерохрония), изменение ее количества (гетерометрия) и изменение ее типа (гетеротипия).
9. Гетеротопия, вероятно, ответственна за эволюцию крыльев летучих мышей, панциря черепах и подобных лепесткам чашелистиков у тюльпанов.

10. Гетерохрония важна в формировании конечностей во всем животном царстве и в развитии цветка у покрытосеменных растений.
11. Гетерометрия может быть ответственна за утрату конечностей змеями и за спецификацию половых органов у некоторых покрытосеменных растений.
12. Гетерометрия в комбинации с гетерохронией могут отвечать за фенотипы клювов у дарвиновых вьюрков и за размер человеческого мозга.
13. Гетеротипия может изменять функциональные свойства белков и существенно влиять на развитие. Ограничения анатомии насекомых, имеющих только шесть ног, являются одним из примеров, зерно кукурузы — другим.
14. Ограничения развития предупреждают проявление некоторых фенотипов. Такие ограничения могут иметь физический характер (невозможность вращающихся конечностей), быть морфогенетическими (средний палец не бывает короче соседних), плейотропическими (больше шейных позвонков у птиц, чем у млекопитающих) или следствием избыточности, что стабилизирует фенотип.
15. Генетическая ассимиляция, при которой фенотипическая черта, первоначально индуцированная средой, становится (через процесс отбора) продуцируемой генотипом во всех допустимых условиях среды, была документирована в лабораторных условиях.
16. Системы эпигенетического наследования включают эпиаλληли, в которых наследуемые паттерны метилирования ДНК могут регулировать экспрессию гена. Сильно метилированный ген может быть таким же нефункциональным, как генетически мутантный аллель.
17. Для развития часто требуются симбиотические организмы, а варианты этих организмов могут вызывать различные типы развития. Кроме того, симбиотические микробы могут облегчать основные события развития, такие как происхождение многоклеточности, а также матки и плаценты у плацентарных млекопитающих.
18. Эволюционная биология развития способна продемонстрировать, как маленькие генетические или эпигенетические изменения могут генерировать большие фенотипические изменения и делают возможным формирование новых анатомических структур.

Приложение

Краткое руководство по поиску и пониманию научных статей по биологии развития

Исследование для исследования

Если вы спросите ученого, ради чего он встает на работу рано утром (или ложится под утро, как того требуют некоторые эксперименты), скорее всего, он ответит, что ради трепета от обретения новых знаний. Но какие знания считаются новыми? Прежде чем определиться с темой будущего исследования, ученый должен выяснить, какие идеи в интересующей его области приняты на данный момент. Для этого необходимо провести анализ научной литературы.

Поисковое исследование

В Приложении предложен способ проведения поискового исследования научной литературы (**рис. П.1**). В начале процесса рекомендуется завести бумажный или электронный блокнот для записи истории вашего поиска. Особенно полезно фиксировать некоторые наводящие вопросы, которые можно использовать для последующей оценки полезности данного справочного источника.

Интересуетесь, почему наши руки отличаются от ног? Начните с прочтения главы «Развитие конечности» в этом учебнике. Посетите библиотеку для получения дополнительных книг по этой обширной теме. Во время изучения источников обратите внимание на аспекты этой темы, которые вызывают у вас любопытство, и, что особенно важно, выявляйте под-



Рис. П.1. Алгоритм поиска научной литературы по биологии развития

А

Убедитесь, что выбран «PubMed». Введите здесь ключевые слова.

Выберите формат между «Summary» (как показано здесь) и «Abstract» (для более полного описания).

Измените фильтр поиска. Чаще всего используются «Most Recent» и «Best Match».

Кликайте по ссылке на интересующую статью

Выбрав их, а затем изменив формат, вы увидите результаты только для этих статей.

Б

Здесь перечислены другие статьи, цитирующие выбранную вами.

Full text links

В

Download PDF

Full text links

Рис. П.2. Навигация по PubMed. **А.** Домашняя страница PubMed предоставляет возможность поиска в базе данных PubMed по ключевым словам. Несколько раскрывающихся меню позволяют уточнить критерии поиска и отображать результаты в различных форматах. **Б.** Когда вы нажимаете на статью в своих результатах, PubMed отправляет вас на страницу с аннотацией и ссылкой для получения PDF-файла статьи. На этой странице перечислены также похожие статьи, а иногда и работы, в которых цитируется выбранная вами статья. **В.** Щелкнув «Full text links», вы попадаете на страницу, где можно скачать PDF-файл. Если статья не находится в свободном доступе, возможно, вам придется искать конкретную интересующую статью, используя ресурсы библиотеки учреждения, имеющего соответствующую подписку

темы в рамках вашего общего интереса и отмечайте конкретные ключевые слова.

Как только вы приобретете некоторое фундаментальное понимание вашей темы и обзаведетесь начальным запасом ключевых слов, откройте вашу любимую поисковую систему (например, Google), введите некоторые из ключевых слов и изучите найденные веб-сайты. Вероятнее всего, вы найдете онлайн-ресурсы этого учебника (которыми вам следует воспользоваться) или электронные энциклопедии вроде Википедии. На этом уровне литературного исследования ваша цель состоит в том, чтобы продолжить создание списка актуальных тем, которые могли бы улучшить ваше понимание предмета и направить ваше исследование к более конкретным подтемам.

Навигация по базе данных PubMed

PubMed — это основная база данных, которую мы рекомендуем для прямого поиска научных статей по биологии развития (**рис. П.2А**; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Сначала выберите релевантные «обзорные» статьи по вашей теме (см. рис. П.1, Исследование на уровне темы). Обзорная статья — это синопсис определенной темы в данной области. Такие статьи написаны более доступно и представляют собой резюме данной подтемы. В обзорной статье сформирована проблема в рамках передовой научной области и часто обсуждаются первоочередные вопросы, на которые исследователи должны попытаться ответить. Очень важно, что утверждения, сделанные в обзорах, подкреплены цитатами на подтверждающие их статьи в первичной литературе. Эти цитаты — волшебные ключики к важным статьям, которые вы должны попытаться прочитать самостоятельно. Отметив эти ссылки, вернитесь в PubMed и выполните поиск по ним (рис. П.2Б).

Получение PDF-файла статьи

Далее вам нужно получить полный электронный текст или PDF-версию статьи, которую вы хотите прочитать. К сожалению, не все статьи находятся в свободном доступе. Если вы аффилированы с университетом или научной организацией, то ваше учреждение может иметь подписку на определенные журналы, и в этом случае доступ к версиям PDF может быть предоставлен через ресурсы вашей библиотеки. К счастью, некоторые журналы имеют открытый доступ и все статьи базы PubMed Central можно загружать бесплатно. К полному тексту можно получить доступ через страницу PubMed выбранной статьи (рис. П.2Б), кликнув «Full text links» в правом верхнем углу. Это приведет вас на веб-сайт журнала и точку доступа к статье (рис. П.2В). Страницы доступа к статьям разных журналов выглядят по-разному, но на них всегда имеется ссылка для загрузки PDF-файла.

Определение анатомии исследовательской работы

Как только вы найдете интересную статью, следующим вашим шагом будет извлечение и анализ результатов исследования, которое она описывает. Какие у авторов исследования были вопросы и гипотезы? Какие подходы они использовали для проверки своих гипотез и действительно ли их выводы подтверждены представленными данными?

Типичная научная статья имеет следующие разделы: Название, Авторы, Аннотация и/или Резюме, Введение, Материалы и методы, Результаты исследования, Обсуждение результатов, Благодарности и Ссылки.

Глоссарий

20-Гидроксиэкдизон (20E). Гормон насекомых, инициирующий и координирующий каждую линьку. Активная форма экдизона регулирует изменения в экспрессии генов, которые происходят во время метаморфоза, и сигнализирует о дифференцировке имагинального диска.

3'-Нетранслируемая область (3'-UTR). Область эукариотического гена и РНК после кодона терминации трансляции, которая, хотя и транскрибируется, но не транслируется в белок. Включает область, необходимую для добавления полиА-хвоста, который позволяет транскрипту выходить из ядра.

5'-Нетранслируемая область (5'-UTR, лидерная последовательность). Область эукариотического гена и РНК. В гене это последовательность пар оснований между сайтом инициации транскрипции и сайтом инициации трансляции; в РНК это ее 5'-конец. Не транслируется в белок, но может определять скорость инициации трансляции.

5α-Дигидротестостерон (DHT). Стероидный гормон, полученный из тестостерона под действием фермента 5α-кетостероидредуктазы 2. Необходим для маскулинизации мужской уретры, простаты, полового члена и мошонки.

5-Метилцитозин. «Пятое» основание в ДНК, получаемое ферментативно после репликации ДНК путем модификации цитозина в 5-метилцитозин; модифицироваться могут только цитозины, за которыми следует гуанозин. У млекопитающих около 5% цитозинов в ДНК превращаются в 5-метилцитозин.

Area opaca. Периферическое кольцо клеток бластодермы птиц, которые не отделились от глубоких клеток.

Area pellucida. Область толщиной в одну клетку в центре бластодермы птиц (после отделения от большинства глубоких клеток), которая формирует большую часть эмбриона.

Bicoid. Передний морфоген, необходимый для установления передне-задней полярности у эмбриона *Drosophila*. Функционирует как фактор транскрипции для активации передних генов пробела и как репрессор трансляции для ингибирования задних генов пробела.

BMP4. Белок семейства BMP (bone morphogenetic proteins), активно вовлеченный в развитие нервной системы; например, BMP4, вырабатываемый органами-мишенями, иннервируемыми тройничным нервом, вызывает дифференциальный рост и дифференцировку нейронов. Участвует также в дифференцировке костей. См. **Морфогенетические белки кости**.

Cardia bifida. Состояние, при котором образуются два отдельных сердца в результате манипуляций с эмбрио-

ном или генетических патологий, которые препятствуют слиянию двух эндокардиальных трубок.

CatSper. Катионные (обычно Ca^{2+}) каналы, которые, по-видимому, специфичны для сперматозоидов. Они имеют решающее значение для направленной локомоции сперматозоидов.

ChIP-Seq. Лабораторный протокол, используемый для идентификации точных последовательностей ДНК, связанных с определенными факторами транскрипции или с нуклеосомами, содержащими специфические модифицированные гистоны.

Chordin. Паракринный фактор с активностью организатора. Связывается с BMP4 и BMP2, предотвращает их взаимодействие с рецепторами и таким образом индуцирует дорсальную эктодерму к образованию нервной ткани.

Commissureless (Comm). Эндосомный белок *Drosophila*, экспрессируемый в аксонах до пересечения ими средней линии; направляет белки Robo в лизосому, предотвращая их экспрессию в клеточной мембране.

Corona radiata. Самый внутренний слой клеток кумулюса вокруг яйца млекопитающего, непосредственно примыкающий к *zona pellucida*.

Corpora allata. Железы насекомых, которые выделяют ювенильный гормон во время личиночной линьки.

СрG-островки. Области ДНК, богатые последовательностью СрG: цитозин и гуанозин, связанные нормальной фосфатной связью. Часто такие островки содержатся в промоторах. Транскрипция обычно инициируется поблизости от этих участков, возможно, потому, что они связывают базальные факторы транскрипции, которые рекрутируют РНК-полимеразу II.

Cre-lox. Технология сайтспецифичной рекомбинации, которая позволяет контролировать пространственный и временной паттерн нокаута или нарушения экспрессии гена.

CRISPR. Участок ДНК у прокариот, который при транскрипции в РНК служит направляющей для распознавания сегментов вирусной ДНК. В сочетании с ферментом Cas9 его используют в CRISPR/Cas9 — относительно быстром и недорогом методе редактирования генов.

CXCR4. Рецептор стромального фактора 1 (SDF1). См. также **Стромальный фактор 1**.

Delta. Белковый лиганд для Notch, локализованный на поверхности клетки; участвует в юстакринном взаимодействии и активации сигнального пути Notch.

Dickkopf. В пер. с нем. — толстая голова, тупоголовый. Белок, напрямую взаимодействующий с рецепторами Wnt и предотвращающий передачу Wnt-сигнала.

Dmrt1. Белок, который у птиц, лягушек и рыб, видимо, активирует Sox9 — центральный ген, определяющий развитие по мужскому типу у позвоночных. Необходим также для поддержания структур семенника у млекопитающих.

Doublesex. Ген *Drosophila*, активный как у самцов, так и у самок, РНК-транскрипты которого сплайсируются специфичным для пола способом и продуцируют специфичные для пола транскрипционные факторы. Специфичный для самок фактор транскрипции активирует специфичные для самок гены и тормозит развитие самца; специфичный для самцов фактор транскрипции подавляет женские черты и способствует развитию мужских.

Eph-рецепторы. Рецепторы эфриновых лигандов.

Е-кадгерин. Тип кадгерина, экспрессируемый в эпителиальных тканях, а также во всех эмбриональных клетках ранних млекопитающих (Е обозначает «эпителиальный»). См. **Кадгерины**.

Forkhead. Факторы транскрипции (например, белки Fox, HNF4α), особенно важные в энтодерме, которая будет формировать печень, где они помогают активировать регуляторные области специфичных для печени генов.

Frizzled. Трансмембранный рецептор для паракринных факторов семейства Wnt.

G-белки. Белки, которые связывают ГТФ и активируются или инактивируются ферментами, модифицирующими ГТФ (такими как ГТФазы). Играют важную роль в сигнальных каскадах и в поддержании цитоскелета.

Gurken. Белок, кодируемый геном *Gurken*. Транскрибируется в питающих клетках яичника *Drosophila* и транспортируется в ооцит, где транслируется в белок с передне-задним градиентом. Сигнализирует фолликулярным клеткам, ближайшим к ядру ооцита, постериоризоваться (часть механизма, который установит передне-заднюю ось яйца и будущего эмбриона).

Hedgehog. Семейство паракринных факторов, используемых эмбрионом для индукции определенных типов клеток и для создания границ между тканями. Белки Hedgehog функционируют только в комплексе с молекулой холестерина. У позвоночных есть по крайней мере три гомолога гена *hedgehog* *Drosophila*: *sonic hedgehog* (*shh*), *desert hedgehog* (*dhh*), и *indian hedgehog* (*ihh*).

Hedgehog-сигнальный путь. Активируется при связывании белка Hedgehog с рецептором Patched. При этом конформация белка Patched изменяется так, что он больше не ингибирует Smoothened. Белок Smoothened высвобождает белок Ci из микротрубочек и предотвращает его расщепление. Теперь интактный белок Ci может проникать в ядро, где он действует как *активатор* транскрипции тех же генов, которые он когда-то репрессировал.

Нох-гены. Большое семейство родственных генов, которые определяют (по крайней мере частично) реги-

ональную идентичность в зародыше, особенно вдоль передне-задней оси. Нох-гены кодируют факторы транскрипции, регулирующие экспрессию других генов. Все известные геномы млекопитающих содержат четыре копии комплекса Нох на гаплоидный набор, расположенные на четырех разных хромосомах (*Ноха*—*Нохd* у мыши, *НОХА*—*НОХD* у человека). Гены *Нох*/*НОХ* млекопитающих пронумерованы от 1 до 13, начиная с того конца каждого комплекса, который экспрессируется наиболее антериорно.

Ну-белки. РНК-связывающие белки, которые стабилизируют мРНК, участвующие в развитии нейронов, предотвращая их быструю деградацию. Например, НуА, НуВ, НуС и НуD.

In situ. Лат. «на месте». В своем естественном положении или окружении.

Indel. Инсерция или делеция оснований ДНК.

Izumo. Белок, обнаруженный в экваториальной области зрелых сперматозоидов млекопитающих, который связывается с белком Juno на клеточной мембране ооцита. Эти белки помогают стабилизировать связь сперматозоида и яйцеклетки.

Jagged. Лиганд для Notch участвует в юстакринном взаимодействии и активации сигнального пути Notch.

JAK. Janus-киназные белки, связанные с рецепторами FGF в сигнальном каскаде JAK-STAT.

JAK-STAT-каскад. Сигнальный путь, активируемый паракринными факторами, влияющими на трансмембранные рецепторы, связанные на цитоплазматической стороне с белками JAK. Связывание лиганда с рецептором фосфорилирует семейство транскрипционных факторов STAT.

Juno. Белок клеточной мембраны ооцитов млекопитающих, который играет важную роль в связывании с белком сперматозоидов Izumo.

lacZ. Ген *E. coli*, кодирующий β-галактозидазу; часто используется в качестве репортерного гена.

Lim-гены. Гены, кодирующие факторы транскрипции, которые структурно связаны с белками, кодируемыми Нох-генами.

MADS-box-факторы транскрипции. Семейство белков, которые имеют общий консервативный мотив в своих ДНК-связывающих доменах; встречаются в разных группах эукариот.

Maskin. Белок ооцитов амфибий, который создает репрессивную петлевую структуру в мРНК, предотвращая ее трансляцию. Создает петлю путем взаимодействия с двумя другими белками — белком, связывающим элемент цитоплазматического полиаденилирования (СРЕВ), и фактором eIF4E, которые связаны с противоположными концами мРНК.

Mesp1. Фактор транскрипции, играющий важную роль в консервативном среди позвоночных механизме спецификации клеток сердца. См. также **Nkx2-5**.

NAD⁺-киназа. Фермент, который активируется во время раннего ответа яйцеклетки морского ежа на сперматозоид, превращает NAD⁺ в NADP⁺. Последний служит

коферментом в биосинтезе липидов и важен для создания большого количества новых клеточных мембран, необходимых во время дробления. NADP^+ используется также для создания NAADP.

Nanos. Белок, имеющий решающее значение для установления передне-задней полярности эмбриона *Drosophila*. мРНК *nanos* заякорена на заднем конце ооцита и транслируется после овуляции и оплодотворения. Белок Nanos диффундирует из заднего конца, а Bicoid — из переднего, устанавливая два противоположных градиента, которые определяют передне-заднюю полярность эмбриона.

Nkx2-5. Фактор транскрипции, который имеет решающее значение в механизмах спецификации клеток сердца, консервативных среди позвоночных. См. также **Mesp1**.

Nodal. Паракринный фактор и член семейства TGF β , участвующий в установлении лево-правой асимметрии у позвоночных и беспозвоночных.

Noggin. Белок-антагонист, блокирующий BMP-сигнализацию.

Notch. Трансмембранный белок, рецептор участников юстакринных взаимодействий Delta, Jagged или Serrate. Взаимодействие с лигандом приводит к конформационным изменениям Notch, которые позволяют части его цитоплазматического домена отщепляться протеазой presenilin-1. Отщепленный фрагмент входит в ядро и связывается с неактивным транскрипционным фактором семейства CSL, активируя его.

N-кадгерин. Тип (нейральный) кадгеринов, который экспрессируется на высоком уровне в клетках развивающейся центральной нервной системы. Может играть роль в передаче нервных сигналов. См. также **Кадгеринины**.

Oskar. Белок, участвующий в создании передне-задней оси яйца и будущего эмбриона *Drosophila* путем связывания в задней области яйца транскриптов белка Nanos, который будет специфицировать задний конец будущего эмбриона.

p53. Фактор транскрипции, который может остановить клеточный цикл, вызвать клеточное старение в быстро делящихся клетках, инициирует апоптоз и активирует ферменты репарации ДНК. Один из важнейших регуляторов деления клеток.

PAL-1. Материнский фактор транскрипции в ооцитах нематоды *C. elegans*; необходим для дифференцировки клеток-потомков P1, одного из бластомеров двухклеточного эмбриона.

PAR-белки. Найдены в цитоплазме ооцитов нематоды *C. elegans*; участвуют в детерминировании передне-задней оси зародыша после оплодотворения.

PIE-1. Материнский фактор транскрипции в ооците нематоды *C. elegans*; необходим для детерминации развития клеток зародышевой линии.

Piwi. Один из белков, наряду с Tudor, Vasa и Nanos, экспрессирующийся в половых клетках и подавляющий экспрессию генов.

Polycomb. Семейство белков, которые связываются с конденсированными нуклеосомами, сохраняя гены в неактивном состоянии.

P-гранулы. Зародышевая плазма у *C. elegans*. В начале дробления собираются в бластомере P4, клетке-предшественнике зародышевой линии.

Ras A. G-белок в сигнальном пути рецепторных тирозинкиназ. Мутации в гене *RAS* служат причиной большей части раковых опухолей человека.

Rho-ГТФазы. Семейство молекул, включающее RhoA, Rac1 и Cdc42, которые превращают растворимый глобулярный актин в фибриллярную форму актиновых филаментов, заякоренных на молекулах кадгерина. Способствуют миграции клеток с помощью ламеллоподий и филоподий, а также кадгерин-зависимого ремоделирования цитоскелета.

Robo. См. также **Roundabout**.

Roundabout (Robo). Белки, являющиеся рецепторами для slit-белков; контролируют пересечение средней линии комиссуральными аксонами.

Royalactin. Белок, который индуцирует личинку медоносной пчелы стать королевой. Попадает в личинку от рабочих пчел при кормлении маточным молочком, связывается с рецепторами EGF в жировом теле личинки и стимулирует выработку ювенильного гормона, повышающего уровень белков желтка, необходимых для производства яиц.

RTK-путь. См. **Рецепторные тирозинкиназы**.

R-кадгерин. Ретинальный тип кадгерина, имеющий большое значение в формировании сетчатки. См. также **Кадгеринины**.

R-спондин 1 (Rspo1). Небольшой растворимый белок, который регулирует Wnt-путь и является критическим для образования яичников у млекопитающих.

Sex-lethal (Sxl). Аутосомный ген *Drosophila*, участвующий в определении пола. Кодирован фактор сплайсинга, который инициирует каскад событий процессинга РНК, в итоге приводящих к образованию специфичных для самцов и самок факторов транскрипции, белков Doublesex. См. также **Doublesex**.

SFK. Киназы семейства Src. См. также **Src**.

Shh. См. **Sonic hedgehog**.

SKN-1. Материнский фактор транскрипции в ооците нематоды *C. elegans*, контролирующей путь клетки EMS, одной из клеток четырехклеточного эмбриона, которая маркирует его вентральную область.

Slit. Белки внеклеточного матрикса, которые являются хеморепульсивными; участвуют в подавлении миграции клеток нервного гребня и контроле роста комиссуральных аксонов.

Smad. Семейство факторов транскрипции, активируемых членами суперсемейства TGF β . См. также **SMAD-сигнальный путь**.

SMAD-сигнальный путь. Сигнальный путь, активируемый членами суперсемейства TGF β . Лиганд TGF β связывается с рецептором TGF β типа II, что позволяет этому рецептору связываться с рецептором TGF β

типа I. Как только два рецептора оказываются в тесном контакте, рецептор типа II фосфорилирует серин или треонин на рецепторе типа I, тем самым активируя его. Активированный рецептор типа I теперь может фосфорилировать белки Smad. Белки Smad 1 и 5 активируются рецепторами семейства BMP, тогда как Smads 2 и 3 активируются рецепторами активина, Nodal и семейства TGF β . Фосфорилированные белки Smad связываются с Smad4 и образуют комплекс факторов транскрипции, который направляется в ядро.

Sonic hedgehog (Shh). Основной паракринный фактор семейства hedgehog. Имеет различные функции в разных тканях зародыша. Например, он секретируется хордой и индуцирует вентральную область нервной трубки формировать дно нервной трубки. Он участвует в установлении лево-правой асимметрии, дифференцировке первичной кишечной трубки, правильном формировании перьев у птиц, дифференцировке склеротома и формировании паттерна передне-задней оси почек конечностей.

Sox9. Аутосомный ген, участвующий в нескольких процессах развития, особенно в формировании кости. В половом валике млекопитающих он вызывает образование семенника, и человек с генотипом XX и дополнительной копией *SOX9* развивается как мужчина.

Spina bifida. Врожденная патология, вызванная неполным закрытием позвоночника вокруг спинного мозга, обычно в нижней части спины. Существуют различные степени тяжести, наиболее серьезной из которых является то, что нервные складки тоже не смыкаются.

Src. Семейство ферментов (киназы семейства Src, SFK), которые фосфорилируют остатки тирозина; участвуют во многих сигнальных событиях, включая реакции конусов роста на хемоаттрактанты.

Sry. Область Y-хромосомы, детерминирующая пол. Ген *Sry* кодирует фактор, детерминирующий развитие семенников млекопитающих. Он активен в половом валике, вероятно, только несколько часов, в течение которых он синтезирует фактор транскрипции Sry, основная роль которого заключается в активации гена *Sox9*, необходимого для формирования семенника.

STAT. Сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции. Семейство транскрипционных факторов, часть сигнального пути JAK-STAT. Играют важную роль в регуляции роста костей плода человека.

Torpedo. Рецептор белка Gurken, участник процесса установления передне-задней оси яйца и будущего эмбриона *Drosophila*. Экспрессируется в терминальных фолликулярных клетках яйцевой камеры и связывается с Gurken на яйце, что сигнализирует этим фолликулярным клеткам дифференцироваться в задние фолликулярные клетки и синтезировать молекулу, которая активирует протеинкиназу A в яйце.

Trithorax. Семейство белков, которые рекрутируются, чтобы сохранить память о транскрипционном статусе областей ДНК, когда клетка проходит митоз; сохраняет активные гены активными.

Tudor. Белок, который наряду с Piwi, Vasa и Nanos экспрессируется в половых клетках для подавления

экспрессии генов. Вовлечен также в установление передне-задней полярности эмбриона *Drosophila* путем локализации заднего морфогена Nanos.

Vasa. Белок наряду с Tudor, Piwi и Nanos экспрессирующийся в половых клетках для подавления экспрессии генов. Вовлечен также в установление передне-задней полярности у эмбриона *Drosophila* путем локализации заднего морфогена Nanos.

VegT-сигнальный путь. Сигнальный путь, участвующий в образовании дорсально-вентральной полярности и спецификации клеток организатора у эмбрионов амфибий. Активирует экспрессию связанных с Nodal паракринных факторов в клетках вегетативного полушария эмбриона, которые, в свою очередь, активируют транскрипционный фактор Smad2 в мезодермальных клетках над ними, активируя гены, которые придают этим клеткам свойства организатора.

Vg1. Семейство белков, часть суперсемейства TGF β . Играет важную роль в спецификации мезодермы у эмбрионов амфибий. См. также **Трансформирующие факторы роста β** .

Wnt. Семейство генов цистеинобогатых гликопротеиновых паракринных факторов. Название представляет собой сочетание названия гена сегментной полярности *wingless Drosophila* с названием одного из его гомологов позвоночных *integrated*. Белки Wnt играют решающую роль в установлении полярности конечностей насекомых и позвоночных, поддержании пролиферации стволовых клеток и в нескольких этапах развития мочеполовой системы.

Wnt4. Белок семейства Wnt; у млекопитающих участвует в определении первичного пола, развитии почек и временной регуляции мейоза. Экспрессируется в бипотенциальных гонадах, но не обнаруживается в XY-гонадах, становящихся семенниками; сохраняется в XX-гонадах, становящихся яичниками. См. также **Wnt**.

Wnt7a. Белок семейства Wnt, особенно важный для определения дорсально-вентральной полярности конечности четвероногих; экспрессируется в дорсальной, но не вентральной эктодерме почек конечностей. Если устранить экспрессию в этой области, то как дорсальная, так и вентральная стороны конечности образуют вентральные структуры, например вентральные подушечки пальцев. См. также **Wnt**.

Wnt-сигнальные пути. Каскады сигнальной трансдукции, которые инициируют связывание белка Wnt с его мембранным рецептором. Связывание может инициировать несколько различных путей («канонический» и «неканонический») для активации Wnt-чувствительных генов в ядре.

Zebrabow. Трансгенные рыбки *Danio*, используемые для запуска экспрессии различных комбинаций и различного количества флуоресцентных белков в клетках маркированием их всеми цветами радуги, что можно использовать для идентификации каждой отдельной клетки в ткани, органе или целом эмбрионе.

Zona pellucida 1, 2 и 3 (ZP1, ZP2, ZP3). Три основных гликопротеина, обнаруженные в *zona pellucida* яйца млекопитающего; *zona pellucida* человека содержит также

ZP4. Участвуют в связывании сперматозоида относительно (но не абсолютно) видоспецифичным образом.

Zona pellucida. Гликопротеиновая оболочка (внеклеточный матрикс) вокруг яйца млекопитающего, которую синтезирует и секретирует растущий ооцит.

α -Фетопротенин. Белок, который у млекопитающих связывает и инактивирует плодный эстроген (но не тестостерон) как у мужского, так и у женского зародыша; у грызунов имеет решающее значение для нормальной половой дифференциации мозга.

β -Катенин. Белок, способный действовать как якорь для кадгеринов или как фактор транскрипции (индуцируется Wnt-сигнальным путем). Важен для спецификации зародышевых листков у всех животных.

А

Абаксиальные мышцы. Мышцы, происходящие из боковых частей миотома.

Автономная спецификация. Способ коммитирования клеток, при котором бластомер наследует детерминанту, обычно набор транскрипционных факторов из цитоплазмы яйца, и эти факторы транскрипции регулируют экспрессию генов, направляя клетку на определенный путь развития.

Автопод. Дистальные кости конечности позвоночных: кости запястья, пясти и фаланг пальцев передней конечности, кости предплюсны, плюсны и фаланг пальцев задней конечности.

Автотрофность. Процесс, встречающийся у растений и бактерий, заключающийся в синтезе сложных органических соединений с использованием неорганических веществ и световой или химической энергии.

Адгезия. Соединение клеток друг с другом или с внеклеточным субстратом, который обеспечивает поверхность для перемещения клеток.

Адэпителиальные клетки. Клетки, которые на ранних стадиях развития личинки голометаболических насекомых мигрируют в имажинальные диски; дают начало мышцам и нервам на стадии куколки.

Акрон. Передняя область тела членистоногих (в том числе насекомых); расположена спереди от рта и включает в себя мозг.

Акросома (акросомный пузырек). Колпачковидная органелла, вместе с ядром образующая головку сперматозоида. Содержит протеолитические ферменты, которые переваривают оболочки яйцеклетки, позволяя сперматозоиду получить доступ к мембране яйцеклетки и слиться с ней.

Акрсомная реакция. Ca^{2+} -зависимое слияние акросомы с поверхностной мембраной сперматозоида, приводящее к экзоцитозу и выделению протеолитических ферментов, которые позволяют сперматозоиду растворить внеклеточный матрикс и оплодотворить яйцеклетку.

Акрсомный вырост. Пальцеобразный вырост на головке сперматозоида, удлиняющийся в результате полимеризации актиновых филаментов на ранних стадиях оплодотворения у морских ежей и многих других видов.

Содержит поверхностные молекулы для видоспецифичного распознавания сперматозоида и яйцеклетки.

Аксиальный протокадгерин. Тип протокадгерина, экспрессируемый в клетках презумитивной хорды, который позволяет им отделиться от параксиальной (сомитобразующей) мезодермы и образовать хорду. Обнаружен в эмбрионах амфибий. См. также **Протокадгерин**.

Аксон. Тонкий отросток нервных клеток. Передает сигналы (потенциалы действия) мишеням в центральной и периферической нервной системе. Миграция аксонов имеет решающее значение для развития нервной системы позвоночных.

Аксонема. Часть реснички или жгутика, состоящая из двух центральных микротрубочек, окруженных рядом из 9 дуплетных микротрубочек. Моторный белок динеин, прикрепленный к дуплетным микротрубочкам, обеспечивает силу для функционирования ресничек и жгутиков.

Активины. Члены суперсемейства белков TGF β ; включают Nodal, важный для спецификации различных областей мезодермы и для появления различий между левой и правой сторонами тела позвоночных.

Активирующие сперматозоид пептиды. Мелкие хемотаксические пептиды, которые обнаруживают в слизистой оболочке иглокожих. Они диффундируют в окружающую морскую воду и являются видоспецифичными, привлекая только сперматозоиды того же вида. Пример: резакт, найденный у морского ежа *Arbacia punctulata*.

Активирующий ГТФазу белок (GAP). Белок, который позволяет G-белку Ras быстро вернуться в неактивное состояние путем гидролиза ГТФ, связанного с Ras, обратно в ГДФ. Ras активируют рецепторные тирозинкиназы.

Активные формы кислорода. Побочные продукты метаболизма, которые могут повредить клеточные мембраны и белки и разрушить ДНК. Генерируются митохондриями в случае недостаточного восстановления атомов кислорода и включают супероксидные ионы, гидроксильные («свободные») радикалы и перекись водорода.

Актомиозиновое сокращение. Силы сокращения внутри клетки, вызванные прикреплением миозина к актиновым филаментам и его перемещением вдоль них. Примеры: сокращение мышечных клеток; апикальное сокращение клеток нервной пластинки в шарнирных точках.

Аллантоис. Внезародышевая оболочка амниот, которая хранит продукты обмена и помогает осуществлять газообмен. Формируется из спланхноплеуры в каудальном конце первичной полоски. У млекопитающих размер аллантоиса зависит от того, насколько хорошо продукты азотного обмена могут быть удалены хорионической плацентой. У рептилий и птиц аллантоис становится большим мешком, поскольку нет другого способа вывести токсичные побочные продукты метаболизма из развивающегося эмбриона.

Аллометрия. Изменения в развитии, которые происходят, когда разные части организма растут с разной скоростью.

Альтернативный сплайсинг пре-мРНК. Способ получения нескольких разных белков из одного гена путем сшивания разных наборов экзонов и генерации разных типов мРНК.

Амакринные нейроны. Нейроны сетчатки позвоночных, у которых отсутствуют большие аксоны. Большинство из них являются тормозными. См. также **Сетчатка**.

Аметаболия. Характер развития насекомых, при котором личиночная стадия отсутствует и насекомое претерпевает прямое развитие до мелкой взрослой формы после переходной стадии нимфы.

Амнион («водная оболочка»). Оболочка, окружающая и защищающая эмбрион и окружающую его амниотическую жидкость. Формируется из двух слоев соматоплевры: эктодермальных эпителиальных клеток и мезодермальной соединительной ткани.

Амниотическая жидкость (околоплодные воды). Секрет, который служит «амортизатором» для развивающегося эмбриона и предотвращает его высыхание.

Амниоты. Группа позвоночных, зародыш которых развивает амнион, окружающий тело эмбриона. Включает рептилий, птиц и млекопитающих. Сравните с **Анамнии**.

Ампула. Дистальный участок яйцевода млекопитающих, расположенный около яичника, где происходит оплодотворение.

Анаген. Фаза роста волоса фолликула, во время которой волосы растут в длину.

Аналогичный. Структуры и/или их соответствующие компоненты, сходство которых возникает из-за выполнения ими аналогичной функции, а не по причине общего происхождения. Пример: крыло бабочки и крыло птицы. Сравните с **Гомологичный**.

Анамнии. Рыбы и амфибии; группы позвоночных, которые не образуют амнион во время эмбрионального развития. Сравните с **Амниоты**.

Ангиобласты. От *ангио* — кровеносный сосуд и *бласт* — быстро делящаяся клетка (обычно стволовая клетка). Клетки-предшественники кровеносных сосудов.

Ангиогенез. Процесс, в ходе которого первичная сеть кровеносных сосудов, возникшая в результате васкулогенеза, перемоделируется в артерии, капиллярное русло и вены.

Ангиопоэтины. Паракринные факторы, которые опосредуют взаимодействие между эндотелиальными клетками и перитцитами.

Андроген. Маскулинизирующее вещество, обычно стероидный гормон, например тестостерон.

Анейрогенный. Без какой-либо нервной иннервации.

Анеуплоидия. Состояние, при котором одна или несколько хромосом либо отсутствуют, либо присутствуют в нескольких копиях.

Анимальная шапочка. У амфибий — крыша бластоцели (в анимальном полушарии).

Анимальное полушарие. Верхняя половина яйца, содержащая анимальный полюс. У эмбрионов амфибий клетки анимального полушария имеют небольшое количество желтка, быстро делятся и становятся подвижными.

Анимальный полюс. Полюс яйца или эмбриона, где концентрация желтка относительно низкая; противоположный вегетативному полюсу конец яйца.

Аноиксис. Быстрый апоптоз, возникающий, когда эпителиальные клетки теряют связь с внеклеточным матриксом.

Аномалия. Нарушение или врожденный порок, вызванный экзогенными агентами (тератогенами), такими как растения, химические вещества, вирусы, радиация или гипертермия.

Аноректальное соединение. Встреча энтодермы и эктодермы около заднего прохода у эмбрионов позвоночных.

Антиклинальные деления. Деления клеток растений, при которых новые клеточные стенки располагаются перпендикулярно поверхности растения. Сравните с **Периклинальные деления**.

Антимюллеров гормон (антимюллеров фактор, мюллеров ингибирующий фактор). Паракринный фактор семейства TGF β , секретируемый эмбриональными семенниками; вызывает апоптоз эпителия и разрушение базальной пластинки мюллеровых протоков, предотвращая образование матки и яйцеводов.

Антимюллеров фактор. См. **Антимюллеров гормон**.

Анэнцефалия. Врожденная патология (почти всегда летальная), возникающая в результате неспособности закрыть передний невропор. Передний мозг остается в контакте с амниотической жидкостью и впоследствии дегенерирует, поэтому свод черепа не формируется.

Аортогонадомезонефрос. Мезенхимальная область в спланхоплевре боковой пластинки рядом с брюшной аортой, которая продуцирует гемопоэтические стволовые клетки.

Апертура. Отверстие. У растений это участок оболочки пыльцевого зерна, где стенка тоньше или мягче, из которой может выходить растущая пыльцевая трубка.

Апикальная меристема побега. У растений — меристема на кончике растущего побега, которая является источником стволовых клеток для всех надземных органов растений, например листьев и цветов. См. также **Меристема**.

Апикальная эктодермальная складка. Эктодерма, покрывающая мезенхиму развивающегося плавника рыбы и способствующая развитию лучей; производное апикального эктодермального гребня у лучеперых рыб после проксимальной разметки стилопода.

Апикальная эпидермальная шапочка. Образуется в раннем эпидермисе ампутированной конечности хвостатой амфибии и действует подобно апикальному эктодермальному гребню во время нормального развития конечности.

Апикально-базальная ось. Ось апикально-базальной поляризации. См. также **Апикальный**; **Базальный**.

Апикальное сокращение. Сужение апикального конца клетки, вызванное локальным сокращением актомиозиновых комплексов на апикальной границе.

Апикальный. Находящийся на вершине или вверху. Пример: апикальный слой вашего эпидермиса — это самый внешний слой, обращенный к внешней среде. Сравните с **Базальный**.

Апикальный эктодермальный гребень. Гребень вдоль дистального края зачатка конечности, который становится основным сигнальным центром для развивающейся конечности. Его функции включают: (1) поддержание подлежащей мезенхимы в пластическом, пролиферирующем состоянии, которое обеспечивает линейный (проксимально-дистальный) рост конечности; (2) поддержание экспрессии молекул, которые генерируют передне-заднюю ось; (3) взаимодействие с белками, определяющими передне-заднюю и дорсально-вентральную оси, в результате чего каждая клетка получает инструкции о том, как дифференцироваться.

Апомиксис. Бесполое размножение у растений, при котором эмбрион образуется из клеток, которые не делятся мейотически.

Апоптоз. Программируемая клеточная гибель. Апоптоз является активным процессом, который убирает ненужные структуры (например, хвост метаморфозирующей лягушки, ткани молочной железы у самцов млекопитающих), контролирует число клеток в определенных тканях и формирует сложные органы (например, нёбо, сетчатку, пальцы и сердце). См. также **Аноиксис**; **Некротические зоны**.

Ароматаза. Фермент, превращающий тестостерон в эстрадиол (форма эстрогена). Избыток ароматазы в окружающей среде связан с гербицидами и другими химическими веществами и, как считается, способствует нарушениям репродуктивной функции (демаскулинизации и феминизации, особенно у самцов амфибий).

Артериальный конус. Тракт оттока от сердца; наряду с артериальным стволом станет основой аорты и легочных артерий.

Артериальный проток. Сосуд, который образуется из левой VI дуги аорты, служит шунтом между эмбриональной/плодной легочной артерией и нисходящей аортой у млекопитающих. Обычно он закрывается при рождении (в противном случае возникает патологическое состояние, называемое открытым артериальным протоком).

Артериальный ствол. Предшественник тракта оттока сердца, который вместе с артериальным конусом будет формировать основание аорты и легочной артерии.

Артротом. Мезенхимные клетки в центре сомита, которые вносят вклад в склеротом, становятся суставами позвонков, межпозвонковыми дисками и проксимальными частями ребер.

Архентерон. Первичная кишка зародыша. У морского ежа образуется при инвагинации вегетативной пластинки в бластоцель.

Асимметрия одиночных стволовых клеток. Способ деления стволовых клеток, при котором в каждом де-

лении образуются два типа клеток: стволовая клетка и коммитированная клетка.

Астроглиальные клетки (астроциты). Разнообразный класс звездчатых (*астро*) глиальных клеток, которые выполняют множество функций, в том числе устанавливают гематоэнцефалический барьер, реагируют на воспаление в ЦНС и поддерживают гомеостаз синапсов и нейротрансмиссию.

Астроциты. См. **Астроглиальные клетки**.

Ауксины. Семейство растительных гормонов, которые регулируют рост и форму зародыша, а также органов взрослых растений. Наиболее распространенным ауксином является индол-3-уксусная кислота (IAA).

Аутокринное взаимодействие. Взаимодействие, при котором клетки, которые выделяют паракринные факторы, сами же реагируют на них.

Аутофагия. Внутриклеточная система, которая удаляет и заменяет поврежденные органеллы и стареющие клетки.

Афферент. Структура, несущая к чему-либо. Например, нейроны, которые передают информацию из сенсорных рецепторных клеток (например, звуковые волны от уха, световые сигналы от сетчатки, сенсорные ощущения от кожи) в центральную нервную систему (спинной и головной мозг). Или сосуды, которые несут жидкость (например, кровь) к какой-либо структуре.

Ахондроплазия. Состояние, при котором хондроциты преждевременно прекращают пролиферировать, что приводит к формированию укороченных конечностей (ахондропластическая карликовость). Часто вызвана мутациями, которые преждевременно активируют ген *FgfR3*.

Ацетилирование. См. **Ацетилирование гистонов**.

Ацетилирование гистонов. Добавление отрицательно заряженных ацетильных групп к гистонам, которое нейтрализует основной заряд лизина и ослабляет связь гистонов и, таким образом, активирует транскрипцию.

Б

Базальная пластинка (базальная мембрана). Специализированные, тесно сплетенные слои внеклеточного матрикса, которые лежат в основании эпителия, состоящие в основном из ламинина и коллагена IV типа. Эпителиальные клетки прикрепляются к базальной пластинке отчасти благодаря связыванию между интегринами и ламинином.

Базальные факторы транскрипции. Факторы транскрипции, которые специфически связываются с сайтами, богатыми CpG, образуя «седло», которое способно рекрутировать РНК-полимеразу II и позиционировать ее для транскрипции.

Базальный. Находящийся в основании или внизу. Пример: базальный слой эпидермальных клеток — самый нижний слой, который находится на базальной пластинке. Сравните с **Апикальный**.

Базальный диск. «Подошва» гидры; позволяет животному прилипать к камням или подводным частям растений.

Базальный слой (*stratum germinativum*). Внутренний слой как зародышевого, так и взрослого эпидермиса. Этот слой содержит эпидермальные стволовые клетки, прикрепленные к базальной мембране.

Бактероид. Особое состояние бактерии, которая дифференцируется как часть симбиотического комплекса с корнями бобовых.

Белки bHLH. Семейство транскрипционных факторов типа «спираль-петля-спираль» (basic helix-loop-helix), включающее белки scleraxis, миогенных регуляторных факторов (MyoD, Myf5 и миогенин) и c-Мус.

Белки теплового шока (heat shock proteins). Межклеточные белки, индуцируемые стрессом, помогают другим белкам формировать правильную структуру и поддерживать свои функции.

Белое вещество. Аксональная (в отличие от нейрональной) область головного и спинного мозга. Название происходит от того факта, что миелиновые оболочки придают аксонам беловатый цвет. Сравните с **Серое вещество**.

Белок переднего градиента тритона (pAG). Фактор, высвобождаемый нейронами в бластеме регенерирующей конечности хвостатой амфибии, который считают фактором, необходимым для пролиферации клеток бластемы.

Белочная оболочка. Толстая беловатая капсула внеклеточного матрикса, в которую заключен семенник млекопитающих.

Бергмановская глия. Тип клеток радиальной глии; направляет тонкий отросток через весь нейроэпителий развивающегося мозжечка.

Бесхвостые (Anura). Лягушки и жабы. Сравните с **Хвостатые**.

Бивалент (тетрада). Четыре хроматиды гомологичной пары хромосом и их синаптонемный комплекс во время профазы первого мейотического деления.

Билатеральное голобластическое дробление. Тип дробления, обнаруженный в основном у оболочников, в котором первая плоскость дробления устанавливает право-левую плоскость симметрии зародыша, а каждое последующее деление симметрично относительно этой плоскости. Таким образом, половина эмбриона, сформированная с одной стороны первой плоскости дробления, является зеркальным отражением другой половины.

Билатерии (трехслойные). Животные, для которых характерна двусторонняя симметрия тела и наличие трех зародышевых листков (эктодерма, энтодерма и мезодерма). Включают в себя все группы животных, за исключением губок, стрекающих, гребневиков и трихоплакс.

Биндин. Белок (30,5 кДа) акросомного выроста сперматозоидов морского ежа, обеспечивающий видоспецифичное узнавание сперматозоида и яйцеклетки во время оплодотворения.

Биндиновые рецепторы. Видоспецифичные рецепторы на желточной оболочке яиц морского ежа, которые связываются с биндином на акросомном выросте сперматозоида во время оплодотворения.

Биология развития. Дисциплина, изучающая эмбриональные и другие процессы развития, такие как замена старых клеток новыми, регенерация, метаморфоз, старение и развитие патологических состояний, таких как рак.

Биопленки. Маты микроорганизмов, например бактерий, которые создают внеклеточный матрикс; регулируют оседание личинок многих морских беспозвоночных.

Биопсия хориона. Взятие образца из плаценты на 8–10-й неделе беременности для выращивания эмбриональных клеток и последующего анализа на наличие или отсутствие определенных хромосом, генов или ферментов.

Биполярные интернейроны. Нейроны в сетчатке, расположенные между фоторецепторами (палочками и колбочками) и ганглиозными клетками и передающие сигналы между ними.

Бипотенциальная гонада (индифферентная). Общая ткань-предшественник, формирующаяся из полового валика млекопитающих, от которой происходят женские и мужские половые железы.

Бисфенол А. Синтетическое химическое соединение, обладающее структурным сходством с эстрогеном, используемое в производстве пластмасс и антипиренов. Вызывает нарушения мейоза, репродуктивной функции и предраковые состояния у грызунов.

Бластема. Группа недифференцированных клеток-предшественников, которые образуются в месте ампутации у некоторых организмов; способна расти и дифференцироваться, заменяя ампутированную ткань.

Бластодерма. Слой клеток, образующихся на анимальном полюсе во время дробления телолецитальных яиц, например рыб, рептилий и птиц. Поскольку желток, сконцентрированный в вегетативной области яйца, препятствует дроблению, только небольшое количество анимальной цитоплазмы, свободной от желтка, способно дробиться. Во время развития бластодерма окружает желток со всех сторон и образует зародыш. У *Drosophila* и других животных с поверхностным дроблением бластодерма формируется из цитоплазмы на периферии яйца.

Бластодиск. Небольшая область на анимальном полюсе телолецитальных яиц рыб, птиц и рептилий, содержащая цитоплазму без желтка, где может происходить дробление и формироваться эмбрион. После дробления бластодиск становится бластомерой.

Бластомер. Клетка дробящегося эмбриона, возникающая в результате митоза.

Бластопор. Точка инвагинации, где начинается гастрულიция. У вторичноротых становится анусом. У первичноротых чаще всего становится ртом.

Бластоцель. Заполненная жидкостью полость бластулы.

Бластоциста. Бластулуподобная стадия развития млекопитающих. Полость бластоцисты ограничена на поверхности клетками трофобласта и содержит с одной стороны внутреннюю клеточную массу.

Бластула. Ранний эмбрион, состоящий из сферы клеток, окружающих внутреннюю заполненную жидкостью полость, бластоцель.

Боковая граница сомита. Граница между примаксиальными и абаксиальными мышцами, а также между дермой, происходящей из сомитов и происходящей из боковой пластинки.

Боковая пластинка. См. **Мезодерма боковой пластинки.**

Большие микромеры. Ярус клеток, образующихся из микромеров при пятом делении дробления эмбриона морского ежа. Станут клетками первичной мезенхимы, которые образуют скелетные спикеры личинки.

Борозды дробления. Бороздка, образованная в клеточной мембране делящейся клетки путем стягивания кольца микрофиламентов.

Брэйноу. Генетический метод, заключающийся в экспрессии различных комбинаций и количества различных флуоресцентных белков в клетках, окрашивающихся всеми цветами радуги, что можно использовать для идентификации каждой отдельной клетки в ткани, органе или целом эмбрионе.

Брюшная бороздка. Инвагинация около 1000 клеток презумптивной мезодермы, составляющих вентральную среднюю линию эмбриона в начале гастрюляции у *Drosophila*.

Брюшная полость. Отделение целома, окружающее органы брюшной полости. Сравните с **Перикардальная полость**; **Плевральная полость**.

Бугорок оплодотворения. Выступ на поверхности яйца, где яйцеклетка и сперматозоид слились во время оплодотворения. Возникает в результате полимеризации актина и обеспечивает цитоплазматический мост, позволяющий ядру сперматозоида и проксимальной центриоли проникнуть в яйцеклетку.

Булба (bulge). Область волосяного фолликула, которая является нишей для стволовых клеток.

Бурые жировые клетки (бурый жир). Жировые клетки, формирующиеся из центральной части дермомиотома. Производят тепло, в отличие от белых жировых клеток, накапливающих липиды; содержат многочисленные митохондрии и рассеивают энергию в виде тепла вместо синтеза АТФ.

Быстрый блок полиспермии. Механизм, с помощью которого предотвращается слияние дополнительных сперматозоидов с оплодотворенной яйцеклеткой морского ежа путем изменения электрического потенциала до более положительного уровня. Не обнаружен у млекопитающих.

В

Вагусный нервный гребень. Клетки нервного гребня из области шеи на границе черепного и туловищного нервного гребня. Вместе с крестцовым нервным гребнем дает начало парасимпатическим кишечным ганглиям, которые контролируют перистальтические движения кишечника.

Васкулогенез. Создание *de novo* сети кровеносных сосудов из мезодермы боковой пластинки. См. также **Внезародышевый васкулогенез**.

Вегетативная клетка (трубчатая клетка). Одна из двух клеток, образующихся при делении ядра микроспо-

ры в пыльцевых зернах покрытосеменных растений. Охватывает генеративную клетку и создает пыльцевую трубку при опылении.

Вегетативная пластинка. Участок утолщенных клеток на вегетативном полюсе бластулы морского ежа.

Вегетативная ротация. Перестройки внутренних клеток во время гастрюляции лягушки, в результате которых презумптивные клетки глоточной энтодермы оказываются рядом с бластоцелем и непосредственно над инволюирующей мезодермой.

Вегетативное полушарие. Нижняя часть яйцеклетки, где желток более концентрирован. Желток может быть препятствием для дробления, как у зародышей амфибий, и заставляет вегетативные клетки медленнее делиться и меньше двигаться во время эмбриогенеза.

Вегетативный полюс. Содержащий желток конец яйца или эмбриона, располагающийся напротив анимального полюса.

Веллус (пушок). Короткие и шелковистые волосы плода и новорожденного; остаются на многих частях человеческого тела, которые обычно считают безволосыми, такие как лоб и веки. В других областях тела веллусные волосы уступают место более длинным и толстым «терминальным» волосам.

Венозный синус. Задняя область развивающегося сердца, где расположены две главные желточные вены, приносящие кровь к развивающемуся сердцу. Тракт притока в предсердную область.

Вентральная пластинка. Вентральная область нервной трубки; важна для установления дорсально-вентральной полярности. Формируется в результате индукционного воздействия Sonic hedgehog, выделяемого из соседней хорды. Становится вторичным центром сигнализации, который тоже выделяет Sonic hedgehog, формируя градиент с наивысшей концентрацией в вентральной области.

Вентральный путь (вентрально-латеральный путь). Миграционный путь клеток туловищного нервного гребня, которые проходят вентрально через переднюю часть склеротома и вносят вклад в симпатические и парасимпатические ганглии, адреномедуллярные клетки и ганглии дорсальных корешков.

Вентрикулярная зона. См. **Желудочковая зона.**

Вентрикулярно-субвентрикулярная зона. Область головного мозга, которая содержит нейральные стволовые клетки и способна к нейрогенезу у взрослых.

Вертикальная передача. Относительно симбиоза: передача симбионтов от одного поколения к другому через половые клетки, обычно яйца.

Взрослые стволовые клетки. См. **Стволовые клетки взрослого организма.**

Висцеральная мезодерма. Слой мезодермы боковой пластинки, наиболее близкой к энтодерме, отделенный от париетальной мезодермы целомической полостью. Вместе с энтодермой образует спланхноплевру. Формирует сердце, капилляры, гонады, висцеральную брюшину и серозные оболочки, которые покрывают органы, а также брыжейки и клетки крови.

Висцеральная энтодерма. Область первичной энтодермы эмбриона млекопитающего, где клетки контактируют с эпибластом. См. **Первичная энтодерма**.

Витальные красители. Красители, используемые для маркировки живых клеток. В эмбриологии витальные красители используют для отслеживания миграции клеток во время развития и для создания карт презумптивных судеб конкретных областей эмбриона.

Вителлогенез. Формирование белков желтка, которые откладываются в первичном ооците.

Внезародышевая энтодерма. Образуется в результате отслоения клеток гипобласта от эпибласта птиц или внутренней клеточной массы млекопитающих и образует выстилку желточного мешка.

Внезародышевый васкулогенез. Формирование кровяных островков в желточном мешке (т. е. вне эмбриона).

Внеклеточный матрикс. Макромолекулы, которые секретируют клетки в свое непосредственное окружение, образуя область межклеточного материала в промежутках между клетками. Внеклеточный матрикс состоит из коллагена, протеогликанов и множества специализированных гликопротеиновых молекул, таких как фибронектин и ламинин.

Внешний желточный синцитиальный слой. Область желточного синцитиального слоя у эмбрионов рыб. Образуется из синцитиальных ядер желтка, которые продвигаются вегетативно, всегда оставаясь спереди от края бластодермы в ходе эволюции. См. также **Желточный синцитиальный слой**.

Внешний зернистый слой. Герминальная зона нейробластов мозжечка, которые мигрируют из герминального нейроэпителлия на наружную поверхность развивающегося мозжечка.

Внутренне-наружный градиент развития. Процесс развития в неокортексе и остальной части мозга, в котором нейроны, возникшие раньше всех, образуют слой, ближайший к желудочку, а последующие нейроны проходят большие расстояния, чтобы сформировать более поверхностные слои.

Внутренний желточный синцитиальный слой. Область желточного синцитиального слоя эмбрионов рыб. Образуется из синцитиальных ядер, которые движутся под бластодермой и окружают желточную клетку. См. также **Желточный синцитиальный слой**.

Внутренний зернистый слой. Слой в мозжечке, который образуется при миграции гранулярных клеток из наружного зернистого слоя обратно в желудочковую зону.

Внутренняя клеточная масса. Небольшая группа внутренних клеток в бластоцисте млекопитающего, которая в конечном счете разовьется в собственно эмбрион и связанные с ним желточный мешок, аллантаис и амнион.

Внутренняя некротическая зона. Зона запрограммированной гибели клеток в развивающейся конечности четвероногих, разделяющая локтевую и лучевую кости передней конечности и большую и малую берцовые кости задней конечности.

Внутризародышевый васкулогенез. Формирование кровеносных сосудов при эмбриональном органогенезе. Сравните с **Внезародышевым васкулогенезом**.

Водянистая влага. Питательная жидкость, омывающая хрусталик глаза позвоночных животных и обеспечивающая давление, необходимое для стабилизации кривизны глаза.

Возрасты. Этапы между личиночными линьками у голометаболических насекомых. На этих этапах личинка (например, гусеница) питается и увеличивается в размере между каждой линькой до конца стадии последнего возраста, когда превращается в куколку.

Волокна Пуркинье. Модифицированные клетки сердечной мышцы во внутренних стенках желудочков, специализирующиеся на быстрой проводимости сократительного сигнала. Необходимы для синхронизации сокращений желудочков у амниот.

Волосковые клетки. Сенсорные рецепторы, превращающие движение жидкости в электрические сигналы. Во внутреннем ухе они находятся в кортиевом органе улитки для слуха и в полукруглых каналах для чувства равновесия. Кроме того, они расположены в боковой линии органов рыб и земноводных и служат для рецепции движения и изменения давления в воде.

Вольфов проток (мезонефрический проток, нефрический проток). У позвоночных — проток развивающейся экскреторной системы, который растет вместе с мезонефрической мезодермой и индуцирует ее образовывать почечные канальцы. У амниот он позже дегенерирует у самок, но у самцов дает начало придаткам семенника и семявыносящим протокам.

Временная коллинеарность. Механизм, который контролирует время активации Нох-гена, происходящей сначала спереди и постепенно продвигающейся назад; устанавливает пространственную коллинеарность экспрессии Нох-генов относительно их 3'-5'-геномной организации.

Врожденная гиперплазия надпочечников. Состояние, вызывающее женский псевдогермафродитизм из-за избытка тестостерона.

Врожденная патология. Любая патология, с которой человек рождается. Может быть наследственной или иметь экологическую причину (например, воздействие тератогенных растений, лекарств, химических веществ, радиации и т. д.), а также может быть идиопатической (т. е. причина неизвестна).

Вторичная мезенхима. См. **Скелетогенная мезенхима**.

Вторичная нейруляция. Процесс, который формирует заднюю часть нервной трубки путем слияния мезенхимных клеток в плотный шнур, впоследствии образующий полости, которые сливаются в полую трубку.

Вторичное определение пола. Процесс формирования внегонадных половых признаков под влиянием гормонов, продуцируемых гонадами. Это относится к мужской и женской системе протоков и наружных половых органов, а у многих видов — к половым различиям размеров тела, голосовых хрящей и мускулатуры.

Вторичноротые. Животные (включая иглокожих, оболочников, головохордовых и позвоночных), во время эмбрионального развития которых первое отверстие (т. е. blastopore) становится анусом, а второе отверстие — ртом. Сравните с **Первичноротые**.

Вторичные личинки. Личинки, обладающие тем же основным планом тела, что и взрослые; например, гусеницы и головастики. Сравните с **Первичные личинки**.

Вторичные сперматоциты. Пара гаплоидных клеток, возникших в результате первого мейотического деления первичного сперматоцита, которые затем завершают второе деление мейоза с образованием четырех гаплоидных сперматид.

Вторичный гипобласт (эндобласт). Лежит в основе эпибласта в двухслойной бластодерме птиц. Лист клеток, полученных из глубоких желтковых клеток на заднем крае бластодермы, которые мигрируют вперед, вытесняя гипобластные островки (первичный гипобласт). Не вносят вклад в собственно эмбрион, а вместо этого формируют части внезародышевых оболочек, в частности желточного мешка, и обеспечивают химические сигналы, которые специфицируют миграцию клеток эпибласта.

Вторичный ооцит. Гаплоидный ооцит, который возникает в результате первого мейотического деления, вместе с первым полярным тельцем.

Выбор пути. Первый шаг в спецификации аксональной связи, при котором аксоны перемещаются по маршруту, приводящему их к определенной области эмбриона.

Выбор цели. Второй шаг в спецификации аксональной связи, при котором аксоны, как только достигают правильной области, распознают и связываются с набором клеток, с помощью которых они могут образовывать стабильные соединения.

Вылупившаяся бластула. Свободно плавающий эмбрион морского ежа, образовавшийся после того как клетки анимального полушария синтезируют и выделяют фермент, который переваривает оболочку оплодотворения.

Высшие растения (эмбриофиты). Наземные растения; в жизненном цикле имеется период эмбриогенеза.

Выходящий транспорт. Процесс, при котором белки-переносчики перемещают вещество изнутри клетки наружу. Пример: PIN-белки в растениях используют выходящий транспорт для перемещения ауксина изнутри клетки наружу.

Г

Гамета. Специализированная половая клетка, с помощью которой размножающиеся половым путем родители передают хромосомы своим потомкам; яйцеклетка или сперматозоид.

Гаметогенез. Производство гамет.

Гаметофит. Гаплоидная стадия жизненного цикла у растений и водорослей, в которую производятся гаметы (яйца и сперматозоиды); половая фаза. Сравните с **Спорофит**.

Ганглии. Кластеры тел нервных клеток, аксоны которых образуют нервы.

Ганглии дорсальных корешков (DRG). Сенсорные спинномозговые ганглии, происходящие из клеток туловищного нервного гребня, которые мигрируют по вентральному пути и остаются в склеротоме. Сенсорные нейроны DRG соединяются центрально с нейронами в дорсальном роге спинного мозга.

Ганглиозные клетки сетчатки. Нейроны в сетчатке глаза, аксоны которых направляются в оптический тектум головного мозга. Ориентирами для них выступают белки семейств нетринов, slit-белков, семафоринов и эфоринов.

Гаптотаксис. Направленная миграция клеток по субстрату согласно градиенту адгезивности.

Гастрюла. Стадия зародыша, следующая за гастрюляцией и содержащая три зародышевых листка, которые будут взаимодействовать и формировать органы тела.

Гастрюляция. Процесс, включающий перемещение бластомеров зародыша относительно друг друга, который приводит к образованию трех зародышевых листков.

Гемангиобласты. Быстро делящиеся клетки, обычно стволовые, которые образуют кровеносные сосуды и клетки крови.

Гемиметаболия. Форма метаморфоза насекомых, включающая стадии преднимфы, нимфы и имаго (взрослое насекомое).

Гемогенные эндотелиальные клетки. Первичные эндотелиальные клетки в вентральной области дорсальной аорты, происходящие из боковой пластинки. Дают начало гемопоэтическим стволовым клеткам, которые мигрируют в печень и костный мозг и становятся гемопоэтическими стволовыми клетками взрослого организма.

Гемопоз (кроветворение). Образование клеток крови.

Гемопоэтические стволовые клетки. Тип плюрипотентных стволовых клеток, генерирующий серию промежуточных клеток-предшественников, потенции которых ограничены определенными линиями клеток крови. Продуцируют все клетки крови и лимфоциты организма.

Гемопоэтическое индуктивное микроокружение. Клеточные области, индуцирующие различные наборы факторов транскрипции в мультипотентных гемопоэтических стволовых клетках; эти факторы транскрипции определяют путь развития, которым следуют потомки этих клеток.

Генеративная клетка. У покрытосеменных растений — клетка пыльцевого зерна, которая делится, чтобы произвести два ядра мужских гамет.

Генетическая ассимиляция. Процесс, посредством которого фенотипический признак, первоначально возникший только в ответ на какое-либо воздействие окружающей среды, путем отбора перенимается генотипом, после чего признак формируется даже в отсутствие воздействия окружающей среды, которое сначала было необходимо.

Генетическая гетерогенность. Возникновение схожих фенотипов в результате мутаций в разных генах.

Гензенковский узелок (первичный узелок). Локальное утолщение клеток на переднем конце первичной полочки эмбрионов птиц. В центре находится углубление в форме воронки (иногда называемое первичной ямкой), через которое клетки мигрируют внутрь эмбриона, образуя хорду и прехордальную пластинку. Гензенковский узелок является функциональным эквивалентом дорсальной губы бластопора амфибии (т. е. организатора) и зародышевого щитка рыб.

Генитальный диск. Область личинки *Drosophila*, дающая начало мужским или женским гениталиям, которые развиваются из отдельных клеточных популяций генитального диска под влиянием паракринных факторов.

Генные регуляторные сети (GRN). Паттерны, генерируемые взаимодействиями между факторами транскрипции и их энхансерами, которые помогают определить курс развития.

Геном. Полная последовательность ДНК отдельного организма.

Геномная эквивалентность. Теория о том, что каждая клетка организма имеет тот же геном, что и любая другая клетка.

Геномный импринтинг. Феномен у млекопитающих, при котором экспрессируется аллель гена, полученный только из сперматозоида или только из яйцеклетки; иногда происходит путем инактивации одного аллеля с помощью метилирования ДНК во время сперматогенеза или оогенеза.

Гены идентичности меристемы цветка. Набор генов у покрытосеменных растений, экспрессия которых запускает развитие цветка, активируя гены идентичности органов цветка и переключая клетки меристемы с пролиферативного на репродуктивный статус. См. также **Гены идентичности органов цветка.**

Гены идентичности органов цветка. Гены покрытосеменных растений (наборы A, B, C, D и E), которые детерминируют расположение и путь развития клеток меристемы цветка.

Гены материнского эффекта. Гены, принадлежащие материнскому геному, которые используются для синтеза мРНК или белков, впоследствии локализующихся в разных областях яйца и влияющих на развитие эмбриона, как в яйце *Drosophila*. См. также **Материнский эффект.**

Гены парного правила. Зиготические гены *Drosophila*, регулируемые продуктами генов пробела. Экспрессируются в семи областях, которые делят эмбрион на поперечные полосы, перпендикулярные переднезадней оси. Мутанты парного правила не имеют структур каждого второго сегмента.

Гены пробела. Зиготические гены *Drosophila*, которые экспрессируются в широких (около трех сегментов шириной) частично перекрывающихся доменах. У мутантов пробела отсутствуют большие области тела (несколько смежных сегментов).

Гены сегментации. Гены, продукты которых делят ранний эмбрион *Drosophila* на серию повторяющихся участков сегментов вдоль передне-задней оси. Включают

гены пробела, парного правила и сегментной полярности.

Гены сегментной полярности. Зиготические гены *Drosophila*, активируемые белками парного правила, мРНК и белковые продукты которых делят эмбрион на участки размером с сегмент, и устанавливают периодичность зародыша. Мутанты сегментной полярности имеют дефекты (делеции, дупликации, инверсии) в каждом сегменте.

Гепарансульфатные протеоглики (HSPG). Одни из наиболее распространенных протеогликанов во внеклеточном матриксе; могут связывать различные паракринные факторы и представлять их в высоких концентрациях рецепторам.

Гепатозектомия. Хирургическое удаление части печени.

Гермарий. У самок *Drosophila* это ниша в передней области яичника, содержащая герминативные стволовые клетки и несколько типов соматических клеток.

Гермафродит. Индивидуум, у которого существуют ткани как яичника, так и семенника, имеющие либо овоциты (гонады, содержащие ткани как яичника, так и семенника) или яичник с одной стороны и яичко — с другой. Сравните с **Гинандроморф.**

Герминальный нейроэпителий. Слой быстро делящихся нервных стволовых клеток толщиной в одну клетку, которые составляют исходную нервную трубку.

Герминальный серп. Область в передней части *area pellucida* бластодермы птиц и рептилий, содержащая гипобласт, вытесненный мигрирующими энтодермальными клетками. Он содержит первичные половые клетки (предшественники половых клеток), которые позже мигрируют к гонадам по кровеносным сосудам.

Герминальный эпителий. Эпителий индифферентной гонады, полученный из висцеральной мезодермы, который будет формировать соматические клеточные компоненты гонад (т. е. неполовые клетки).

Герминативная стволовая клетка. У самки *Drosophila* это стволовая клетка, которая дает начало ооциту.

Герминативный слой. См. **Базальный слой.**

Гетерогенная ядерная РНК. См. **Ядерная РНК.**

Гетерометрия. В пер. с греч. — другая мера. Изменение количества генного продукта как механизм генерации фенотипических вариаций, доступных для естественного отбора.

Гетеротипия. В пер. с греч. — другой вид. Изменение кодирующей области гена, влекущее изменение функциональных свойств синтезируемого белка, как механизм для появления фенотипического изменения, доступного для естественного отбора.

Гетеротопия. В пер. с греч. — другое место. Пространственное изменение экспрессии генов (например, транскрипционных факторов или паракринных факторов) как механизм, генерирующий фенотипические вариации, доступные для естественного отбора.

Гетерофильное связывание. Связывание между различными молекулами, например, когда рецептор в мембране одной клетки связывается с рецептором другого типа

в мембране другой клетки. Сравните с **Гомофильное связывание**.

Гетерохроматин. Хроматин, который остается конденсированным на протяжении большей части клеточного цикла и реплицируется позже, чем большинство других участков ДНК. Обычно транскрипционно неактивен. Сравните с **Эухроматин**.

Гетерохрония. В пер. с греч. — другое время. Временной сдвиг процессов развития как механизм для генерации фенотипических изменений, доступных для естественного отбора. Один модуль изменяет время экспрессии или скорость роста относительно других модулей эмбриона.

Гетерохронный парабриоз. Хирургическое соединение кровеносных систем двух животных разных возрастов; был использован для изучения эффектов старения на стволовых клетках у мышей.

Гиалиновый слой. Оболочка яйца морского ежа, образованная белком гиалином кортикальных гранул. Гиалиновый слой обеспечивает опору для бластомеров во время дробления.

Гибридизация *in situ* на целом объекте. Методика, разработанная для окрашивания специфических последовательностей ДНК или РНК внутри интактных тканей и целых эмбрионов. Позволяет исследователям просматривать целые эмбрионы или их органы, не разрезая их. С помощью этой техники, используя меченые красители РНК-зонды, которые комплементарны мРНК определенных генов, исследователи могут выявить области экспрессии этих генов.

Гинандроморф. От греч. гинос — женщина и андрос — мужчина. Животное, у которого одни части тела мужские, а другие женские. Сравните с **Гермафродит**.

Гиперактивация. Повышенная подвижность, проявляющаяся у капацитированных сперматозоидов некоторых видов млекопитающих. Предполагается, что она необходима для отделения капацитированных сперматозоидов от эпителия яйцеводов, что позволяет им более эффективно проходить через вязкую среду яйцевода и способствует проникновению во внеклеточный матрикс кумулюса.

Гиперморфоз. Удлинение развития за пределы предкового состояния; эволюционный механизм, посредством которого общее время развития увеличивается без изменения скорости развития. Пример: у человека удлинение внутриутробного темпа роста мозга на период после рождения.

Гипертрофические хондроциты. Образуются во время четвертой фазы эндохондрального окостенения, когда хондроциты под действием фактора транскрипции Runx2 прекращают делиться и резко увеличиваются в объеме.

Гипобласт. Внутренний слой утолщенного края бластодермы у гастролы рыб или нижний слой двухслойной зародышевой бластодермы у птиц и млекопитающих. Гипобласт у рыб (но не у птиц и млекопитающих) содержит предшественники как энтодермы, так и мезодермы. У птиц и млекопитающих в него входят пред-

шественники внезародышевой энтодермы желточного мешка.

Гипобластные островки. См. **Первичный гипобласт**.

Гипоморфные мутации. Мутации, которые снижают функцию гена, в отличие от «нулевых» мутаций, приводящих к потере функции белка.

Гипостом. Коническая область на вершине «головы» гидры, на которой расположен рот.

Гипотеза дифференциальной адгезии. Модель, объясняющая закономерности сортировки клеток на основе термодинамических принципов. Клетки взаимодействуют так, чтобы образовать совокупность с наименьшей свободной межфазной энергией и, следовательно, с наиболее термодинамически устойчивой структурой.

Гипотеза организации/активации. Теория о том, что половые гормоны действуют во время эмбрионального или неонатального периода жизни млекопитающего, организуя нервную систему в зависимости от пола, и что во взрослой жизни эти же гормоны могут оказывать временный мотивационный («активационный») эффект.

Гипотеза раковых стволовых клеток. Гипотеза о том, что злокачественная часть опухоли представляет собой либо стволовые клетки взрослого организма, которые вышли из-под контроля своей ниши, либо более дифференцированные клетки, которые восстановили свойства стволовых клеток.

Гирэнцефалия. Наличие многочисленных складок в коре головного мозга, как у людей и китообразных. Сравните с **Лиссэнцефалия**.

Гистобластные гнезда. Кластеры имагинальных клеток, которые образуют брюшко взрослого голометаболического насекомого.

Гистобласты. Имагинальные клетки, которые будут формировать брюшко взрослого голометаболического насекомого; существуют на личиночных стадиях, увеличиваясь в количестве путем деления, вплоть до стадии куколки, когда они начинают свою дифференцировку. См. **Гистобластные гнезда**.

Гистоновые ацетилтрансферазы. Ферменты, размещающие ацетильные группы на гистонах (особенно на лизинах в гистонах H3 и H4). Ацетилтрансферазы дестабилизируют нуклеосомы, так что они легко распадаются, облегчая тем самым транскрипцию.

Гистоновые деацетилазы. Ферменты, которые отщепляют ацетильные группы от гистонов, стабилизируют нуклеосомы и предотвращают транскрипцию.

Гистоновые метилтрансферазы. Ферменты, которые добавляют метильные группы к гистонам и либо активируют, либо подавляют транскрипцию.

Гистоны. Положительно заряженные белки, которые являются основным белковым компонентом хроматина. См. также **Нуклеосома**.

Глазное поле. Область в передней части нервной трубки, которая будет развиваться в нейросетчатку и пигментный эпителий сетчатки.

Глазной бокал. Камера с двухслойной стенкой, сформированная в результате инвагинации стенки зрительного пузырька.

Глазной пузырь. Выпячивание диэнцефалона; индуцирует эктодерму головы к формированию хрусталика.

Глиальное наведение. Механизм, важный для позиционирования молодых нейронов в развивающемся мозге млекопитающих (например, в мозжечке предшественники гранулярных нейронов перемещаются по длинным отросткам бергмановской глии).

Глиальные клетки Мюллера (мюллеровские клетки). Клетки нейросетчатки, которые поддерживают нейроны в ней.

Глиальный нейротрофический фактор (GDNF). Паракринный фактор, который связывается с рецепторной тирозинкиназой Ret. Его продуцирует мезенхима кишечника, которая привлекает клетки вагусного и крестцового нервного гребня, а также метанефрогенная мезенхима, которая индуцирует образование и ветвление почек мочеточника.

Гликогенсинтазакиназа 3 (GSK3). Фермент, разрушающий β -катенин.

Гликозаминогликаны. Сложные кислотные полисахариды, состоящие из неразветвленных цепей, собранных из дисахаридных повторов. Углеводный компонент протеогликанов.

Глия. Поддерживающие клетки, которые в центральной нервной системе происходят из нервной трубки, а в периферической нервной системе — из нервного гребня.

Глотка. Отдел пищеварительной трубки спереди от ответвления дыхательной трубки.

Глоточные дуги (жаберные дуги). Парные структуры из мезенхимной ткани (полученной из параксиальной мезодермы, мезодермы боковой пластинки и клеток нервного гребня), покрытые энтодермой внутри и эктодермой снаружи. Расположены в области глотки зародыша позвоночных; образуют жаберные дуги у рыб и множество скелетных и соединительнотканых структур лица, челюсти, рта и гортани у других позвоночных.

Глоточные карманы. Выпячивания эпителия глотки (энтодермы), образующие парные карманы между глоточными дугами. Дают начало евстахиевым трубам, стенкам миндалин, тимусу, парашитовидным железам и щитовидной железе.

Глоточные щели. Щели (инвагинации) в наружной эктодерме, разделяющие глоточные дуги. Ранние зародыши амниот имеют четыре глоточные щели, но только первая дает начало взрослой структуре (наружный слуховой проход).

Глохидий. Личинка некоторых пресноводных двусторчатых моллюсков; имеет раковину, напоминающую крошечный капкан, которая используется для прикрепления к жабрам или плавникам рыб. Питается тканевыми жидкостями рыбы, пока не отпадает, превращаясь во взрослого моллюска.

Глубокая гомология. Сигнальные пути, состоящие из гомологичных белков, расположенных гомологичным

образом и используемых для одной и той же функции как у первичноротых, так и у вторичноротых.

Глубокие клетки. Популяция клеток в бластуле *Danio*, которые располагаются между поверхностным и желточным синцитиальным слоем и дают начало собственному эмбриону.

Голобионт. Термин для комплексного организма хозяина с его постоянными симбионтами.

Голобластическое дробление. В пер. с греч. — полный. Тип делений дробления, при котором вся яйцеклетка делится на более мелкие клетки, как это происходит у иглокожих, земноводных и млекопитающих.

Головка сперматозоида. Часть сперматозоида, содержащая ядро, акросому и минимум цитоплазмы.

Головная бороздка. Поперечная бороздка, которая образуется во время гастрюляции у *Drosophila* и отделяет будущую область головы (процефалон) от зародышевой полоски, образующей грудь и брюшко.

Головная мезодерма. Мезодерма, расположенная перед туловищной мезодермой и состоящая из несегментированной параксиальной мезодермы и прехордальной мезодермы. Образует головную мезенхиму, которая формирует большую часть соединительных тканей и мускулатуру головы.

Головной вырост. У эмбрионов птиц передняя часть хордомезодермы, которая проходит через гензеновский узелок, мигрирует вперед, и оказывается под клетками, которые образуют передний и средний мозг.

Головной нервный гребень. См. **Черепной нервный гребень.**

Голометаболия. Тип метаморфоза насекомых, который встречается у мух, жуков и бабочек. Стадия прониимфы отсутствует. Из яйца вылупляется личинка (например, гусеницы) и проходит стадии нескольких возрастов между личиночными линьками, в течение которых становится больше, превращается в куколку в процессе метаморфической линьки и, наконец, становится взрослым насекомым (имаго) в результате имагинальной линьки.

Гомеобокс. Последовательность ДНК из 180 пар оснований, характерная для генов, которые кодируют гомеодоменные белки, включая Нох-гены.

Гомеобокс сетчатки. Фактор транскрипции, кодируемый геном *Rx*. Производится в области глаз и помогает специфицировать сетчатку.

Гомеозисная трансформация. Замена одной структуры другой в процессе развития вследствие гомеозисной мутации. См. также **Гомеозисные мутанты.**

Гомеозисные мутанты. Результат мутаций в гомеозисных селекторных генах; организмы, в которых одну структуру заменяет другая (например, когда вместо антенны развивается нога).

Гомеозисные селекторные гены. Класс генов *Drosophila*, регулируемых белковыми продуктами генов пробела, парного правила и сегментной полярности, транскрипция которых определяет путь развития каждого сегмента.

Гомеозисный комплекс (Hom-C). Область 3-й хромосомы *Drosophila*, содержащая как комплекс Antennapedia, так и комплекс bithorax.

Гомеорезис. Явление стабилизации различных клеточных линий и траектории развития организма в ходе построения себя.

Гомеостаз. Поддержание стабильного физиологического состояния с помощью системы обратных связей.

Гомодимер. Две идентичные молекулы белка, связанные друг с другом.

Гомолог. (1) Одна из пары (или большего набора) хромосом с одинаковым общим генетическим составом. Например, диплоидные организмы имеют две гомологичные копии каждой хромосомы, которые наследуются по одной от каждого родителя. (2) Эволюционные признаки у разных видов, сходство которых обусловлено общностью происхождения.

Гомологичные. Структуры и/или их соответствующие компоненты, чье сходство возникает из-за того, что они происходят от общей предковой структуры. Например, крыло птицы и рука человека. Сравните с **Аналогичные**.

Гомофильное связывание. Связывание между подобными молекулами, например, когда рецептор в мембране одной клетки связывается с рецептором того же типа в клеточной мембране другой клетки. Сравните с **Гетерофильное связывание**.

Гонадотропин-рилизинг-гормон (ГРГ; ГнРГ). Пептидный гормон, выделяемый из гипоталамуса; стимулирует гипофиз к выбросу гонадотропинов — фолликулостимулирующего гормона и лютеинизирующего гормона, необходимых для гаметогенеза и стероидогенеза у млекопитающих.

Гониобласт. У самцов *Drosophila* — коммитированная клетка-предшественник, в результате деления которой появляются предшественники сперматозоидов.

Гонциты. Первичные половые клетки млекопитающих, которые достигли полового валика мужского эмбриона и вошли в состав половых шнуров.

Горизонтальная передача. Ситуация, когда хозяин рождается свободным от симбионтов, но впоследствии заражается либо из окружающей среды, либо другими представителями вида. Может также относиться к передаче генов от одного организма к другому без участия размножения, как это может происходить у бактерий. Сравните с **Вертикальная передача**.

Горизонтальные нейроны. Нейроны в сетчатке, которые передают электрические импульсы в плоскости сетчатки; помогают интегрировать сенсорные сигналы, поступающие от множества фоторецепторных клеток.

Градиент активации головы. Морфогенетический градиент у гидры, наивысший у гипостома, позволяющий формировать голову.

Градиент активации подошвы. У гидры — морфогенетический градиент, наивысший у базального диска; позволяет подошвенным структурам образовываться только в одном месте.

Граница нервной пластинки. Граница между нервной пластинкой и эпидермисом.

Гранулеза. Эпителиальные клетки кортикального слоя яичника плода; окружают отдельные половые клетки, которые станут яйцеклетками; вместе с клетками теки будут образовывать овариальные фолликулы, окружающие половые клетки и выделяющие стероидные гормоны. По мере созревания ооцита, вплоть до овуляции, количество клеток гранулезы увеличивается и образует концентрические слои вокруг ооцита.

Гранулярные клетки. Возникают из нейробластов внешнего гранулярного слоя развивающегося мозжечка. Гранулярные нейроны мигрируют обратно к желудочковой (эпендимальной) зоне, где формируют область, называемую внутренним гранулярным слоем.

Группа эквивалентности. В развитии *C. elegans* это группа из шести клеток-предшественников влагалища, каждая из которых способна индуцироваться якорной клеткой.

Д

Двойная отрицательная связь. Регуляторный механизм, при котором репрессор блокирует гены спецификации, и эти гены могут быть разблокированы репрессором этого репрессора. (Другими словами, активация путем репрессии репрессора.)

Двойное оплодотворение. У покрытосеменных растений — процесс, при котором ядро одного спермия объединяется с ядром яйцеклетки, образуя зиготу, а другой спермий сливается с соматической клеткой, образуя триплоидный эндосперм.

Двухслойные. Животные, у которых есть энтодерма и эктодерма, но, как правило, нет настоящей мезодермы. Включает гребневики и стрекающих (медузы, кораллы, гидры, морские анемоны). Сравните с **Билатерии**.

Двухслойный зародышевый диск. Эмбрион амниот перед гастрულიей; состоит из двух слоев — эпибласта и гипобласта.

Дейодиназа II типа. Внутриклеточный фермент, который удаляет атом йода из внешнего кольца тироксина (T_4), превращая его в более активный гормон трийодтиронин (T_3).

Дейодиназа III типа. Внутриклеточный фермент, который удаляет атом йода из внутреннего кольца трийодтиронина (T_3), чтобы преобразовать его в неактивное соединение дийодтиронин (T_2), которое в итоге будет метаболизироваться до тирозина.

Деламинация. Расщепление одного клеточного пласта на два более или менее параллельных листа.

Деминуция хроматина. Фрагментация хромосом непосредственно перед клеточным делением, приводящая к возникновению клеток, в которых остается только часть исходной хромосомы. Происходит во время дробления *Parascaris aequorum* в клетках, которые будут генерировать соматические клетки, в то время как будущие половые клетки защищены от этого явления и сохраняют интактный геном.

Дендритное дерево. Обширное ветвление дендритов некоторых нейронов, например клеток Пуркинье.

Дендриты. Тонкие, разветвленные отростки (дендритное дерево), исходящие из нейронов; дендриты воспринимают электрические импульсы от других клеток.

Дентальная пластинка. Широкое утолщение эпидермы в челюсти, впоследствии разделяющееся на отдельные плакоды, которые вместе с нижележащей мезенхимой образуют зубы.

Дермальная папилла. Компонент мезенхимо-эпителиальной индукции при формировании волос; маленький узелок, образованный дермальными фибробластами под эпидермальным зачатком волоса, стимулирующий пролиферацию вышележащих эпидермальных базальных стволовых клеток, что приводит к образованию стержня волоса.

Дермальная ткань. У животных это ткань (дерма), подстилающая эпидермис, вместе с которым они составляют кожу. У растений — ткань, из которой состоит внешний слой (эпидермис) растения. Эпидермальные клетки и защитные клетки, которые окружают устьица, являются примерами типов клеток, обнаруженных в дермальной ткани.

Дерматом. Центральная часть дермомиотома, которая производит предшественники дермы спины и популяцию мышечных клеток.

Дермомиотом. Дорсально-латеральная часть сомита, содержащая клетки-предшественники скелетных мышц (включая те, которые мигрируют в конечности) и клетки, которые дают начало дерме спины.

Детерминация. Стадия коммитирования, следующая за спецификацией; стадия детерминированности, предположительно необратимая, наступает, когда клетка или ткань способна автономно дифференцироваться, даже если она помещена в нейтральную среду.

Детерминация оси. Процесс развития, посредством которого определяются основные оси тела животного или растения.

Детерминированный. Коммитированный к данному пути развития. Клетка детерминирована, если она поддерживает свое зрелое состояние, даже когда ее помещают в новую среду. См. также **Детерминация**.

Детерминирующий семенник фактор. Белок, кодируемый геном *Sty* в Y-хромосоме млекопитающих, который необходим для формирования семенника, а не яичника.

Дефинитивная энтодерма. Энтодерма, проникающая во время гаструляции амниот внутрь эмбриона через первичную полосу и замещающая висцеральную энтодерму, которая вместе с висцеральной мезодермой боковой пластинки образует желточный мешок и аллантоис.

Децидуа. Материнская часть плаценты, сформированная из эндометрия матки.

Диакинез. Стадия первого мейотического деления, которая отмечает конец профазы I, когда ядерная оболочка разрушается и хромосомы выстраиваются в метафазную пластинку.

Дианауза. Метаболически дремлющая стадия организма, в течение которой развитие и старение приостанавливаются; может наступать на стадии эмбриона, личинки, куколки или взрослого организма.

Диацилглицерин (диацилглицерол, DAG). Вторичный мессенджер IP₃-сигнального пути, синтезируемый из мембранного фосфолипида фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP₂) наряду с IP₃. Активирует протеинкиназу C, которая, в свою очередь, активирует белок, обменивающий ионы натрия на ионы водорода, что повышает pH внутри клетки.

Диацилглицерол. См. **Диацилглицерин**.

Дизиготные близнецы. Разнойцевые близнецы, появляющиеся в результате двух отдельных, но приблизительно одновременных событий оплодотворения. Генетически такие «братские» близнецы — в полном смысле сиблинги. Сравните с **Монозиготные близнецы**.

Диктиотеновая стадия покоя. Стадия удлинённой диплотены первого деления мейоза в первичных ооцитах млекопитающих, на которой они остаются до момента овуляции, когда завершают мейоз I и становятся вторичными ооцитами.

Динеин. Моторный белок, передвигающийся по микротрубочкам. Это фермент АТФаза, который гидролизует АТФ, превращая выделенную химическую энергию в механическую. У ресничек и жгутиков динеин прикрепляется к микротрубочкам аксонемы, что обеспечивает движущую силу для активного скольжения наружных дублетных микротрубочек, вызывающего изгиб жгутика или реснички.

Диплотена. В пер. с греч. — двойная нить. Четвертая и последняя стадия профазы I первого деления мейоза, когда синаптонемный комплекс разрушается и две гомологичные хромосомы начинают разделяться, но остаются прикрепленными в точках хиазм, где происходит кроссинговер. Следует за стадией пахитены.

Дисгенез. В пер. с греч. — плохое начало. Дефектное развитие.

Дискоидальное дробление. Тип меробластического дробления телоленицальных яиц, при котором деления происходят только в небольшой области бластодиска, как у птиц, рептилий и рыб.

Дискоидальное меробластическое дробление. См. **Дискоидальное дробление**.

Диссоциация. Способность одного модуля развиваться иначе, чем другие.

Дистальная концевая клетка. Отдельная неделяющаяся клетка, расположенная в конце каждой гонады у *C. elegans*, которая поддерживает митотические деления ближайших половых клеток, ингибируя их переход к мейозу.

Дифференциальная экспрессия генов. Основной принцип генетики развития: несмотря на то что все клетки организма содержат один и тот же геном, различные типы клеток экспрессируют крайне разнообразные наборы специфических белков. Дифференциальная экспрессия генов, дифференциальный процессинг РНК, дифференциальная трансляция мРНК и дифференциальная модификация белков — все это позволяет про-

водить практически неограниченную дифференциацию типов клеток.

Дифференциальный процессинг РНК. Сплайсинг предшественников мРНК в транскрипты, кодирующие разные белки, за счет разных комбинаций потенциальных экзонов.

Дифференцировка. Процесс, посредством которого неспециализированная клетка специализируется в один из многих типов клеток, составляющих тело.

Дифференцирующая терапия. Лечение рака с использованием транскрипционных факторов и других молекул для «нормализации» рака, т. е. для того, чтобы заставить раковые клетки вместо непрерывной пролиферации вернуться к дифференцированному состоянию.

Диэнцефалон (промежуточный мозг). Каудальный отдел преэнцефалона; будет образовывать глазные пузыри, шишковидную железу и таламический и гипоталамический отделы головного мозга, которые получают входящие нейронные сигналы от сетчатки.

Диэтилstilбестрол (DES). Потенциальный экологический эстроген. Прием DES беременными женщинами вызывает нарушения полового развития у их дочерей и приводит к бесплодию, субфертильности, внематочным беременностям, аденокарциномам и другим последствиям.

Длинные некодирующие РНК (lncRNA). Регуляторы транскрипции, которые инактивируют гены на одной из двух хромосом диплоидного организма. Например, длинная некодирующая РНК Xist участвует в инактивации генов на второй X-хромосоме женщин. Некоторые lncRNA, по-видимому, специфичны для материнской или отцовской копии гена.

ДНК-связывающий домен. Домен транскрипционного фактора, который распознает определенную последовательность ДНК.

Доказательство потери функции. Отсутствие постулируемой причины приводит к отсутствию постулируемого эффекта. Элемент «потерей» в стратегии «найди, потеряй, перемести». См. также **Корреляционное доказательство; Доказательство приобретения функции.**

Доказательство приобретения функции. Сильный тип доказательств, при котором инициирование первого события приводит к тому, что второе событие происходит даже в тех случаях, где или когда обычно не происходит ни первое, ни второе событие. Элемент «перемести» в стратегии «найди, потеряй, перемести». См. также **Корреляционное доказательство; Доказательство потери функции.**

Домен белок-белкового взаимодействия. Домен фактора транскрипции, который позволяет ему взаимодействовать с другими белками энхансера или промотора.

Домены транскрипционных факторов. Три основных домена — это ДНК-связывающий домен, *тран*-активирующий домен и домен белок-белкового взаимодействия.

Дорсальная губа бластопора. Местоположение инволюирующих клеток маргинальной зоны во время гаструляции амфибий. Мигрирующие маргинальные

клетки последовательно становятся дорсальной губой бластопора, подворачиваются внутрь и перемещаются вдоль внутренней поверхности наружных клеток анимальной шапочки (т. е. крыши бластоцеля).

Дорсально-вентральная ось. Полярность, разделяющая спину (дорсум) от брюха (вентрум). Применительно к конечности она соответствует направлению от костяшек пальцев (дорсальная часть) к ладони (вентральная часть).

Дорсально-латеральные шарнирные точки. При формировании нервной трубки птиц и млекопитающих это две области сгиба на боковых сторонах нервной пластинки, которые сгибаются две стороны нервной пластинки внутрь друг к другу после того, как медиальная шарнирная точка согнула ее вдоль по средней линии.

Дорсально-латеральный путь. Путь миграции клеток туловищного нервного гребня, которые проходят дорсолатерально ниже эктодермы и становятся меланоцитами.

Дорсальное закрытие. Процесс, в ходе которого две стороны эпидермиса эмбриона *Drosophila* объединяются на дорсальной стороне.

Дорсальный мезентерий. Производная висцеральной мезодермы, фиброзная мембрана, соединяющая энтодерму со стенкой тела. Участвует в образовании петель развивающегося кишечника.

Дорсальный организатор. См. **Организатор.**

Дробление. Серия быстрых митотических делений клеток ранних эмбрионов после оплодотворения. Деления дробления эмбриона происходят без увеличения его массы.

Дуги аорты. Начинаются как симметрично расположенные парные сосуды, которые развиваются внутри парных глоточных дуг и связывают восходящую/вентральную и нисходящую/дорсальную парные аорты. Некоторые из дуг аорты дегенерируют.

Дупликация и дивергенция. Тандемное дублирование гена в результате ошибок репликации. После репликации копии генов могут дивергировать в результате случайных мутаций, создавая различные паттерны экспрессии и новые функции.

Дыхательная трубка. Будущий дыхательный тракт, который формируется как эпителиальное выпячивание глотки, которое позже раздваивается на два легких.

Ж

Жаберные дуги. См. **Глоточные дуги.**

Жгутик. Длинный, подвижный отросток клетки, содержащий центральную аксонему, составленную микротрубочками по схеме 9+2 (9 внешних дуплетов и 2 центральных синглета). Его биение создает движущую силу, как в хвосте сперматозоида. Сравни с **Реснички.**

Желточная клетка. Клетка, содержащая желток в эмбрионе рыбы, после того как цитоплазма, свободная от желтка на анимальном полюсе яйца, делится, образуя отдельные клетки над богатой желтком цитоплазмой. Первоначально все клетки связаны с подлежащей желточной клеткой.

Желточная оболочка. У беспозвоночных — внеклеточный матрикс, который образует волокнистый слой вокруг яйца снаружи от клеточной мембраны и часто участвует в распознавании и видоспецифичном связывании сперматозоидов. Желточная оболочка содержит несколько различных гликопротеинов. Дополнена удлинением мембранных гликопротеинов и белковыми «столбами», которые прикрепляют ее к мембране.

Желточная пробка. Большие энтодермальные клетки, которые в ходе гастрюляции амфибий остаются открытыми на вегетативной поверхности и окружены кольцевым blastopore.

Желточные вены. Вены, сливающиеся с эндокардом; несут питательные вещества из желточного мешка в венозный синус развивающегося сердца позвоночных. У птиц эти вены образуются из кровяных островков желточного мешка, доставляют питательные вещества к эмбриону и транспортируют газы к местам газообмена и от них. У млекопитающих их называют омфаломезентериальными или пупочными венами.

Желточный мешок. Первая внезародышевая оболочка, образованная спланхноплеврой, которая обрастает желток. Обеспечивает питание развивающихся эмбрионов птиц и рептилий. Сообщается со средней кишкой желточным протоком, покрытым непрерывным слоем клеток.

Желточный синцитиальный слой. Клеточная популяция дробящихся эмбрионов *Danio*, которая формируется на девятом или десятом клеточном цикле, когда клетки на вегетативном крае бластодермы сливаются с подлежащей желточной клеткой, образуя кольцо ядер в части цитоплазмы желточной клетки, которая находится прямо под бластодермой. Играют важную роль в направлении некоторых гастрюляционных движений клеток.

Желтый серп. Область цитоплазмы зиготы оболочников, простирающаяся от вегетативного полюса до экватора, которая формируется после оплодотворения путем миграции цитоплазмы, содержащей желтые липидные включения; станет мезодермой. Содержит мРНК факторов транскрипции, которые будут специфицировать мышцы.

Желудочковая зона (вентрикулярная зона). Внутренний слой развивающегося спинного и головного мозга. Образуется из герминального нейроэпителлия исходной нервной трубки и содержит нейральные клетки-предшественники, которые являются источником нейронов и глиальных клеток. Формирует эпендиму.

Желудочковая радиальная глия. Клетки-предшественники, которые находятся в вентрикулярной зоне и дают начало нейронам, внешней радиальной глии и промежуточным клеткам-предшественникам. См. также **Желудочковая зона**.

Желудочковые клетки (эпендимные). Клетки, происходящие из нейроэпителлия, выстилающие желудочки головного мозга и выделяющие спинномозговую жидкость.

Женский пронуклеус. Гаплоидное ядро яйца.

Живорождение. Способ развития, при котором эмбрион развивается в теле матери и рождается из него, а не вылупляется из яйца. Пример: плацентарные млекопитающие. Сравните с **Яйцеживорождение**.

Жужжальца. Пара балансиров на третьем грудном сегменте двукрылых насекомых, например *Drosophila*.

3

Задние кишечные ворота. Переднее отверстие развивающейся задней кишки, которое открывается в область будущей средней кишки, на этом этапе сообщается с желточным мешком.

Задний мозг. См. **Метэнцефалон**.

Задний невропор. См. **Невропор**.

Задняя маргинальная зона. Конец бластодермы цыплят, на котором начинается формирование первичной полоски и который действует как эквивалент ньюкоповского центра амфибий. Клетки задней маргинальной зоны иницируют гастрюляцию и препятствуют тому, чтобы другие маргинальные области формировали свои первичные полоски.

Задняя некротическая зона. Зона запрограммированной гибели клеток на задней стороне развивающейся конечности четвероногого, которая помогает сформировать конечность.

Задняя прогениторная зона (каудальная прогениторная зона). Область в хвостовой почке эмбрионов позвоночных, состоящая из мультипотентных клеток-предшественников нейромезодермы.

Закрытие ростовой пластинки. Вызывает прекращение роста костей в конце полового созревания. Высокие уровни эстрогена вызывают апоптоз в гипертрофических хондроцитах и стимулируют проникновение в ростовую пластинку остеобластов, образующих кости.

Зародышевая линия. Линия клеток, которые становятся половыми клетками; она отделена от соматических клеток; обнаружена у многих животных, включая насекомых, круглых червей и позвоночных. Спецификация зародышевой линии может происходить автономно за счет детерминант, распределяемых по областям цитоплазмы яйца, или может происходить позднее путем индукции соседними клетками.

Зародышевая полоска. Скопление клеток по вентральной средней линии зародыша *Drosophila*, которое образуется во время гастрюляции путем конвергенции и растяжения и включает в себя все клетки, образующие туловище эмбриона, грудь и брюшко взрослой мушки.

Зародышевое кольцо. Утолщенное кольцо клеток по краю глубоких клеток, которое появляется у эмбрионов рыб после того, как бластодерма покрывает около половины желточной клетки. Состоит из поверхностного слоя, эпибласта и внутреннего слоя, гипобласта.

Зародышевые листки. Слои клеток зародыша, возникающие в процессе гастрюляции, которые будут формировать все ткани организма, за исключением половых клеток. У трехслойных животных — эктодерма, мезодерма и энтодерма, у двухслойных — эктодерма и энтодерма.

Зародышевый мешок. Женский гаметофит покрытосеменных растений. Расположен внутри завязи, состоит из восьми или менее клеток, образованных делением гаплоидного ядра клетки мегапоры. См. также **Мегаспоры**.

Зеленый флуоресцентный белок (GFP). Белок, который встречается в природе у некоторых медуз; излучает ярко-зеленую флуоресценцию при воздействии ультрафиолетового света. Ген *GFP* широко используют в качестве трансгенной метки для клеток в различных исследованиях, поскольку клетки, которые экспрессируют *GFP*, легко идентифицировать по ярко-зеленому свечению.

Зигопод. Средние кости конечности позвоночных; локтевая и лучевая в передней конечности или большеберцовая и малоберцовая в задней конечности.

Зигота. Оплодотворенная яйцеклетка с диплоидным хромосомным набором в ядре зиготы, образованном слиянием гаплоидных мужского и женского пронуклеусов.

Зиготена. В пер. с греч. — соединенные нити. Вторая стадия профазы первого мейотического деления, когда гомологичные хромосомы соединяются.

Зона поляризационной активности. Небольшой блок мезодермальной ткани в самой задней части зоны прогресса почки конечности. Определяет передне-заднюю ось развивающейся конечности за счет действия паракринного фактора *Sonic hedgehog*.

Зона прогресса (недифференцированная зона). Интенсивно пролиферирующая мезенхимная зачатка конечности непосредственно под апикальным эктодермальным гребнем. Проксимально-дистальный рост и дифференцировка зачатка конечности становятся возможными благодаря серии взаимодействий между апикальным эктодермальным гребнем и зоной прогресса.

Зонд *in situ*. Комплементарная ДНК или РНК, используемая для определения локализации специфичной последовательности ДНК или РНК в ткани.

Зрительная хиазма. См. **Зрительный перекрест**.

Зрительный нерв. Парный II черепной нерв, формирующийся из аксонов нейросетчатки, которые растут обратно в мозг, перемещаясь по главному стебельку.

Зрительный перекрест (хиазма). У позвоночных — часть нижней части мозга, где два зрительных нерва пересекают срединную линию, образуя крестообразную структуру, после которой часть волокон каждого нерва иннервирует клетки-мишени на противоположной стороне мозга.

И

Изолецитальный. В пер. с греч. — равный желток. Тип яиц с небольшим количеством равномерно распределенных гранул желтка, как у морских ежей, млекопитающих и улиток.

Имагинальная линька. Окончательная линька голометаболического насекомого, когда кутикула взрослого насекомого (имаго) образуется под кутикулой куколки, после чего взрослая особь выходит из куколки.

Имагинальные диски. Кластеры относительно недифференцированных клеток, обособляющиеся для образования взрослых структур. Имагинальные диски будут формировать кутикулярные структуры взрослого насекомого, включая крылья, ноги, усики, жужжальца, глаза, голову, грудную клетку и гениталии у голометаболических насекомых.

Имагинальные клетки. Клетки, существующие на личиночных стадиях голометаболического насекомого, которые будут формировать структуры взрослого насекомого. На личиночных стадиях эти клетки увеличиваются в количестве, но до стадии куколки не дифференцируются; включают имагинальные диски, гистобласты и скопления имагинальных клеток в каждом личиночном органе.

Имагинальный рудимент. Развивается из левого целомического мешка личинки плутеуса и образует структуры взрослого морского ежа.

Имаго. Крылатая и половозрелая особь, взрослое насекомое.

Иммиграция. См. **Ингрессия**.

Инактивация X-хромосомы. У млекопитающих необратимое превращение хроматина одной X-хромосомы в каждой женской (XX) клетке в высококонденсированный гетерохроматин (тельце Барра), что предотвращает избыточную транскрипцию генов X-хромосомы. См. также **Компенсация дозировки**.

Инвагинация. Впячивание участка клеток, очень похожее на углубление в мягком резиновом шаре, появляющееся, если в него ткнуть.

Инвариантность клеточной генеалогии. Ситуация, когда каждая клетка каждого эмбриона данного вида дает начало одинаковому количеству клеток определенного типа. Пример: эмбрионы круглого червя *Caenorhabditis elegans*.

Инволюирующая маргинальная зона. Клетки, которые инволюируют во время гастрюляции *Xenopus*, включают предшественники энтодермы глотки, головную мезодерму, хорду, сомиты, а также сердце, почки и вентральную мезодерму.

Инволюция. Подворачивание или направленное внутрь движение расширяющегося внешнего слоя, происходящее так, что он распространяется по внутренней поверхности оставшихся снаружи клеток.

Ингрессия (иммиграция). Миграция отдельных клеток из поверхностного слоя внутрь эмбриона. Клетки становятся мезенхимными (т. е. обособляются друг от друга) и мигрируют независимо.

Индетерминативный рост. Рост, который не останавливается, в отличие от детерминативного роста, прекращающегося, когда структура достигает генетически заданного размера. В отличие от животных, растения обладают индетерминативным ростом.

Индифферентная гонада. См. **Бипотенциальная гонада**.

Индол-3-уксусная кислота (IAA). Самый распространенный тип ауксинов. См. **Ауксины**.

Индуктор. Ткань, генерирующая сигнал (или сигналы), который вызывает определенное клеточное поведение в какой-то другой ткани.

Индукционные сигналы. Сигналы, генерируемые индукторами; часто в качестве сигналов выступают секретируемые белки, называемые паракринными факторами. См. **Индуктор** и **Паракринный фактор**.

Индукционные сигналы нервной пластинки. Паракринные факторы (например, BMP, Wnt, FGF и Notch), взаимодействие которых специфицируют границы между нейральной и поверхностной эктодермой во время гаструляции. У амфибий индукционные сигналы, секретируемые хордой, достаточны для спецификации нервной пластинки; у курицы границы определяют сигналы, выделяемые вентральной эктодермой и параксиальной мезодермой.

Индукция. Процесс, посредством которого одна клеточная популяция влияет на развитие соседних клеток посредством взаимодействия на близком расстоянии.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки. Клетки взрослого организма, которые были преобразованы в клетки с плюрипотентностью, соответствующей эмбриональным стволовым клеткам. Обычно получают с помощью активации определенных транскрипционных факторов.

Индукцированный хищником полифенизм. Способность модулировать развитие в присутствии хищников для экспрессии более защищенного фенотипа.

Инозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃). Вторичный мессенджер, генерируемый ферментом фосфолипазой C, который высвобождает внутриклеточные запасы Ca²⁺. Играет важную роль в инициации развития морского ежа, в том числе экзоцитоза кортикальных гранул.

Инструктивное взаимодействие. Режим индукционного взаимодействия, при котором сигнал от индуцирующей клетки необходим для инициирования экспрессии нового гена в отвечающей клетке.

Инсулиновый сигнальный путь. Путь с участием рецептора инсулина и инсулиноподобных белков; может быть важным компонентом генетически ограниченных жизненных циклов, в которых подавление инсулинового пути может соответствовать увеличению продолжительности жизни.

Инсулиноподобные факторы роста (IGF). Факторы роста, которые запускают FGF-подобный сигнальный каскад, мешающий другим сигнальным путям, например BMP и Wnt. IGF необходимы для формирования передней нервной трубки, включая головной мозг и сенсорные плакоды амфибий.

Инсулятор. Последовательность ДНК, ограничивающая диапазон, в котором энхансер может активировать экспрессию данного гена (тем самым «изолируя» промотор от активации энхансерами другого гена).

Интеграция. Принцип общей теории систем: объединение и взаимодействие составных частей для образования целого.

Интегрины. Семейство рецепторных белков, названных так в связи с тем, что они интегрируют внеклеточные и внутриклеточные каркасные элементы, позволяя им работать вместе. На внеклеточной стороне интегрины связываются с последовательностями нескольких адгезивных белков внеклеточного матрикса, включая фибронектин, витронектин (в базальной пластинке глаза) и ламинин. На цитоплазматической стороне интегрины связываются с талином и α -актинином, двумя белками, которые соединяются с актиновыми микрофиламентами. Это двойное связывание позволяет клетке двигаться, фиксируясь на внеклеточном матриксе и используя актомиозиновые сокращения.

Интеркинез. Короткий период между окончанием мейоза I и началом мейоза II.

Интеркинетическая ядерная миграция. Движение ядер внутри определенных клеток, когда они проходят через клеточный цикл; наблюдается в герминальном нейроэпителии, в котором ядра перемещаются от базального конца клеток к апикальному вблизи поверхности желудочка, где они подвергаются митозу, после чего снова медленно мигрируют в базальном направлении.

Интерсекс. Состояние, при котором у одного и того же индивидуума наблюдаются и мужские, и женские признаки.

Интерстициальные стволовые клетки. Тип стволовых клеток, обнаруженный в эктодерме гидры, который дает начало нейронам, секреторным клеткам, нематоцитам и гаметам.

Интина. Внутренняя стенка пыльцевого зерна, состоящая в основном из целлюлозы.

Интрамембранозная кость. Кость, образующаяся при интрамембранозном окостенении.

Интрамембранозное окостенение. Образование кости непосредственно из мезенхимы, без хрящевого предшественника. Существует три основных типа интрамембранозных костей: сесамовидные и периостеальные кости, происходящие из мезодермы, и дермальные кости, которые формируются из мезенхимных клеток, происходящих из краниального нервного гребня.

Интроны. Области ДНК в составе гена, некодирующие белок. Сравните с **Экзон**.

Ионофор. Соединение, которое позволяет ионам, например Ca²⁺, диффундировать через липидные мембраны и преодолевать ранее непроницаемые барьеры.

Ипсилатеральный. Анатомический термин, означающий расположение на той же стороне тела.

К

Кавитация. У эмбрионов млекопитающих — процесс, при котором клетки трофобласта создают полость, заполненную жидкостью. Через мембраны клеток трофобласта в центральную полость закачиваются ионы натрия (Na⁺), которые осмотически втягивают воду и таким образом создают и увеличивают полость бластоцисты.

Кадгерины. Кальций-зависимые молекулы адгезии. Трансмембранные белки, которые взаимодействуют

с другими кадгеринами в соседних клетках и имеют решающее значение для установления и поддержания межклеточных контактов, пространственной сегрегации типов клеток и организации морфогенезов.

Каироны. Химические вещества, которые выделяет хищник; могут вызывать защитную реакцию у его добычи.

Каллус. У растений — неупорядоченная растущая масса недифференцированных клеток, которые покрывают рану; эти клетки могут быть индуцированы к формированию меристемы и развитию в побеги и/или корни.

Канализационная модель. У растений — модель для объяснения поляризованного транспорта ауксина вдоль апикально-базальной оси во время развития и регенерации сосудов. Согласно этой модели, сосудистая сеть, апикальная по отношению к развивающейся ткани или заживляющей ране, служит источником ауксина, а базально расположенные развивающиеся или регенерирующие сосудистые клетки служат стоком ауксина.

Канализация. См. Помехоустойчивость.

Канцерогенез. Иницирование онкологического заболевания, при котором доброкачественная клетка превращается в раковую.

Капацитация. Совокупность физиологических изменений, благодаря которым сперматозоид млекопитающих становится способным оплодотворять яйцеклетку.

Кардиальный нервный гребень. Субрегион черепного нервного гребня, который простирается от слуховых (ушных) плакод до третьей пары сомитов. Клетки кардиального нервного гребня сердца развиваются в меланocytes, нейроны, хрящи и соединительную ткань. Кардиальный нервный гребень вносит также вклад в формирование мышечно-соединительнотканной стенки крупных артерий («путей оттока») сердца, а также перегородке, отделяющей легочную циркуляцию от аорты.

Кардиогенная мезодерма. См. Поля сердца.

Кардиомиоциты. Клетки сердца, происходящие из ткани поля сердца; образуют мышечные слои сердца, а также его приток и отток.

Кариокинез. Митотическое деление ядра клетки. Механическим агентом кариокинеза является митотическое веретено.

Карман Ратке. Впячивание эктодермы на крыше ротовой области, которая образует железистую часть гипофиза у позвоночных. Встречает впячивание дна среднего мозга инфундибулом, которое формирует нейрогофиз.

Карта презумптивных зачатков. Диаграммы, полученные в результате отслеживания траектории развития клеток определенных областей эмбриона и «картирования» структур личинки или взрослой особи на область эмбриона, из которой они возникли. Наложение того, «что должно быть» на структуру, которая еще не развилась в эти органы.

Каскады сигнальной трансдукции (сигнальные каскады). Пути ответа клеток на внешние сигналы, осуществляемые путем связывания паракринных факторов

с рецепторами, запускающими серию ферментативных реакций в клетке, которые в свою очередь часто могут иметь несколько конечных эффектов. В качестве конечных эффектов могут выступать регуляция факторов транскрипции (приводящая к экспрессии разных генов в клетках, реагирующих на эти паракринные факторы) и/или регуляция цитоскелета (в результате которой отвечающие на паракринные факторы клетки изменяют свою форму или начинают мигрировать).

Катаген. Фаза регрессии цикла регенерации волосного фолликула.

Катенины. Комплекс белков, которые заякоривают кадгерин внутри клетки. Кадгерин-катениновый комплекс образует классические адгезионные контакты, которые скрепляют эпителиальные клетки и, связываясь с актиновым (микрофиламентным) цитоскелетом, интегрируют эпителиальные клетки в единую механическую структуру. Один из них, β -катенин, также может быть фактором транскрипции.

Каудальная прогениторная зона. См. Задняя прогениторная зона.

Каудальный. Имеющий отношение к хвосту.

Кембрийский взрыв. Быстрая диверсификация жизни в кембрийском периоде (примерно 541 млн лет назад), во время которой появилось большинство основных групп животных, в том числе представленных ныне живущими видами.

Кератиноциты. Дифференцированные клетки эпидермиса, тесно связанные между собой и образующие непроницаемый для воды липидно-белковый слой.

Кишечные ганглии. См. Парасимпатические ганглии.

Клетки зародышевой линии. Клетки, которые образуют гаметы, в том числе первичные половые клетки, развивающиеся сперматозоиды и яйцеклетки, а также зрелые гаметы.

Клетки Кахаля–Ретциуса. Секретирующие рилин клетки в неокортексе прямо под поверхностью мягкой оболочки мозга. Рилин направляет миграцию новорожденных нейронов к пиальной поверхности.

Клетки Лейдига. Клетки семенника, полученные из интерстициальных мезенхимных клеток, окружающих семенные канальцы, которые вырабатывают тестостерон, необходимый для вторичной детерминации пола, а у взрослых — для поддержания сперматогенеза.

Клетки нервного гребня. См. Нейронный гребень.

Клетки-предшественники (транзитные амплифицирующие клетки). Любые предковые клетки (стволовых или прогениторных клеток) определенного типа клеток (например, предшественники нейронов; предшественники клеток крови).

Клетки-предшественники вульвы. Шесть клеток личиночной стадии *C. elegans*, которые будут формировать вульву под действием индукционных сигналов.

Клетки Сертоли. Большие секреторные поддерживающие клетки в семенных канальцах. Участвуют в сперматогенезе, выполняя питающую и поддерживающую сперматозоиды функцию. Секретируют антимюллеров

гормон у плода и обеспечивают нишу для заселяющих семенник половых клеток. Происходят из соматических клеток, которые, в свою очередь, образуются из эпителия полового валика.

Клетки теки. См. **Текальные клетки.**

Клетки типа В. Тип нейронных стволовых клеток, обнаруженных в розетках вентрикулярно-субвентрикулярной области головного мозга; способствуют формированию специфических типов нейронов в обонятельной луковице и стриатуме.

Клеточная бластодерма. Стадия развития *Drosophila*, на которой все клетки располагаются одним поверхностным слоем, покрывающим желточную сердцевину яйца.

Клеточная генеалогия (клеточная линия). Последовательность типов клеток от недифференцированной плюрипотентной стволовой клетки до терминально дифференцированного типа клеток.

Клеточная стенка. Внеклеточный слой снаружи от клеточной мембраны, окружающий клетки растений, грибов и многих прокариот. У наземных растений клеточные стенки жесткие, содержат целлюлозу и другие полимеры; они подавляют движение клеток и ограничивают плоскости деления клеток.

Клеточные клетки мезенхимы. Популяция мультипотентных стволовых клеток, полученная из мезенхимы метанефрической почки; покрывают кончики ветвей почек мочеточника и могут формировать все типы клеток нефрона.

Клоака. Камера энтодермального происхождения на каудальном конце эмбриона, которая станет приемником отходов кишечника, почек и продуктов из половых желез. Амфибии, рептилии и птицы сохраняют этот орган и используют его для выделения гамет, а также жидких и твердых отходов. У млекопитающих клоака разделена перегородкой на урогенитальный синус и прямую кишку.

Клоакальная мембрана. Мембрана на каудальном конце задней кишки, образованная плотно прилегающими энтодермой и эктодермой в месте будущего ануса.

Клонирование. См. **Перенос ядер соматических клеток.**

Клоногенные необласты. Плюрипотентные стволовые клетки плоских червей, которые мигрируют в область раны и регенерируют ткани; образуют регенерационную бластему плоских червей.

Когезины. Белковые кольца, окружающие сестринские хроматиды во время мейоза и обеспечивающие основу для сборки мейотического комплекса рекомбинации; противодействуют растягивающим силам микротрубочек веретена и тем самым удерживают сестринские хроматиды вместе во время первого деления мейоза и способствуют спариванию гомологичных хромосом, обеспечивая рекомбинацию.

Кодон терминации трансляции (стоп-кодон). Последовательность в гене (TAA, TAG или TGA), которая транскрибируется как стоп-кодон в мРНК. При встрече

с этим кодоном рибосома диссоциирует и белок высвобождается.

Кожные кости (dermal bone). Кости, которые образуются в дерме кожи, например большинство костей черепа и лица. Формируются из головной мезодермы или мезенхимных клеток, происходящих из черепного нервного гребня.

Кожные придатки. Видоспецифичные модификации эпидермиса, включающие волосы, чешую, щитки, перья, копыта, когти и рога.

Колбовидные клетки. Инвагинирующие клетки во время гастрюляции амфибий, большая часть которых перемещается внутрь эмбриона, сохраняя при этом контакт с внешней поверхностью посредством тонкой шейки.

Колбочки. Цветочувствительные фоторецепторные клетки в сетчатке. См. **Нейросетчатка.**

Коленчатые плакоды. Пара наджаберных плакод у позвоночных; дают начало сенсорным компонентам парного VII черепного (лицевого) нерва и иннервируют вкусовые сосочки, миндалины и мочки ушей.

Коллаген IV типа. Тип коллагена, который образует тонкую сеть; найден в базальной пластинке — внеклеточном матриксе, находящемся под эпителием.

Коллективная миграция. Миграция подвижных клеток, оказывающих друг на друга скоординированные направленные силы, в противоположность индивидуально мигрирующим клеткам или движению группы клеток, вызванному выталкиванием тканей вследствие пролиферации или интеркаляции.

Коллективная миграция клеток. Движение клеточных слоев, при котором клетки на переднем крае слоя частично обеспечивают двигательную силу, подтягивая остальные клетки за счет ложноножек. Клетки за передним краем, окруженные другими клетками, не могут формировать двигательную псевдоподию из-за контактного торможения движения клеток. Однако во время хемоаттрактивных реакций клетки в задней части кластера могут образовывать актомиозиновые поля, которые оттесняют эти клетки вперед.

Колониальная теория. Теория происхождения многоклеточности, первоначально предложенная Эрнстом Геккелем в 1874 г. Заключается в том, что многоклеточные организмы возникли в результате симбиоза одноклеточных организмов одного и того же вида.

Колонны Терни. Группы преганглионарных автономных моторных нейронов в грудном отделе, входящих в число моторных нейронов, аксоны которых мигрируют из спинного мозга во время развития позвоночных.

Кольцевые каналы. Цитоплазматические связи между циститами, которые становятся яйцеклеткой, и питающими клетками в яйчнике *Drosophila*.

Комбинаторная ассоциация. В генетике развития принцип, постулирующий, что энхансеры содержат участки ДНК, которые связывают факторы транскрипции, и именно эта комбинация факторов транскрипции активирует ген.

Комменсализм. Симбиотические отношения, которые выгодны одному партнеру и не являются ни полезными, ни вредными для другого партнера.

Коммитирование. Описывает состояние, в котором траектория развития клетки становится определенной, хотя отсутствуют явные изменения в клеточной биохимии и функции.

Коммитированные стволовые клетки. Включают мультипотентные стволовые клетки, которые имеют потенциал к дифференцировке в любой из относительно небольшого числа типов клеток (мультипотентные), и только один (унипотентные) клеточный тип.

Компактизация. Уникальный процесс, характерный для дробящихся эмбрионов млекопитающих, осуществляемый молекулой клеточной адгезии E-кадгерин. Клетки у ранних (восьмиклеточных) эмбрионов меняют свои адгезивные свойства и становятся тесно сцепленными друг с другом.

Компенсаторная регенерация. Форма регенерации, при которой дифференцированные клетки делятся, но сохраняют свои характерные функции (например, печень млекопитающих).

Компенсация дозирования. Выравнивание экспрессии продуктов генов, кодируемых X-хромосомой, в мужских и женских клетках. Может быть достигнуто: (1) путем удвоения скорости транскрипции мужской X-хромосомы (*Drosophila*); (2) частичной репрессией обеих X-хромосом (*C. elegans*) или (3) инактивацией одной X-хромосомы в каждой женской клетке (млекопитающие).

Компетентность. Способность клеток или тканей реагировать на специфический индуктивный сигнал.

Комплекс Antennapedia. Область 3-й хромосомы *Drosophila*, содержащая гомеозисные гены *labial (lab)*, *Antennapedia (Antp)*, *sex combs reduced (scr)*, *deformed (dfd)*, и *proboscipedia (pb)*, которые определяют идентичность головного и грудного сегментов.

Комплекс bithorax. Область 3-й хромосомы *Drosophila*, содержащая гомеозисный ген *Ultrabithorax (Ubx)*, который необходим для идентификации третьего грудного сегмента, и гены *abdominal A (abdA)* и *Abdominal B (AbdB)*, отвечающие за идентичность брюшных сегментов.

Комплекс преинициации. Комплекс РНК-полимеразы II на промоторе с транскрипционными факторами на энхансере, объединенных молекулами медиатора транскрипции. Смотрите также **Медиатор транскрипции**.

Комплекс элонгации транскрипции. Комплекс из нескольких факторов транскрипции, который разрывает связь между РНК-полимеразой II и медиатором, позволяя транскрипции (которая была инициирована) продолжаться.

Компонент полярных гранул. Белок, важный для спецификации зародышевой линии и локализованный в полярных гранулах *Drosophila*. Ингибирует транскрипцию генов, специфицирующих соматические клетки, предотвращая тем самым фосфорилирование РНК-полимеразы II.

Конвергентная эволюция. Независимая эволюция сходных черт среди организмов, не связанных общим происхождением, но адаптирующихся к аналогичной среде.

Конвергентное растяжение. Явление, при котором клетки интеркалируют, сужая и одновременно удлиняя ткань. Механизм, используемый для удлинения архентерона в эмбрионе морского ежа, хорды эмбриона асцидии и осевой мезодермы амфибии. Это движение напоминает автомобильное, когда несколько полос должны объединиться в одну.

Консенсусная последовательность. У интронов расположены на 5'- и 3'-концах и сигнализируют о «местах сплайсинга» интрона.

Консервативный дофаминовый нейротрофический фактор (CDNF). Нейротрофин, который увеличивает выживаемость дофаминергических нейронов среднего мозга. См. также **Нейротрофин**.

Контактное торможение локомоции. Механизм, посредством которого клеткам запрещено формировать двигательные псевдоподии вдоль поверхностей контакта с другими клетками. Эти взаимодействия с клеточными мембранами других клеток предотвращают «обратную» миграцию над другими клетками и приводят к «прямой» миграции переднего края клеток.

Контекстная зависимость. Значение или роль отдельного компонента системы (такого как фактор транскрипции) зависит от ее контекста. Например, при формировании суставов конечностей одни и те же ВМР могут вызывать гибель или дифференцировку клеток в зависимости от стадии развития отвечающей клетки.

Конус роста. Подвижный конец нейронального аксона; отвечает за рост нервов.

Концевые клетки. Эндотелиальные клетки, которые в ответ на фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) начинают «прорастать», формируя новый сосуд во время ангиогенеза. См. также **Концевые клетки почки мочеточника**.

Концевые клетки почки мочеточника. Популяция стволовых клеток, которые образуются на кончиках ветвей мочеточника во время образования метанефрической почки.

Концевые почки. Концы ветвей обширного дерева протоков молочных желез млекопитающих. В период полового созревания под влиянием эстрогенов протоки растут за счет удлинения этих почек.

Координированная экспрессия генов. Одновременная экспрессия множества различных генов в конкретном типе клеток. Его основой часто является один транскрипционный фактор (например, Рахб), который имеет решающее значение для нескольких различных энхансерных последовательностей; различные энхансеры дифференциально «праймированы», и связывание одного и того же фактора со всеми энхансерами активирует все гены одновременно.

Корневая апикальная меристема. Меристема на кончике растущего корня растений. См. также **Меристема**.

Коронные клетки. Клетки, соседствующие с узловыми клетками, которые имеют решающее значение для

установления лево-правой оси у эмбрионов млекопитающих. Коронные клетки имеют по одной неподвижной ресничке, которая ощущает движение жидкостей слева направо, вызванное подвижными ресничками на узловых клетках. Это запускает каскад событий в коронных клетках, необходимый для поддержания экспрессии *Nodal* на левой стороне, где он может активировать гены лево- и правосторонности.

Корреляционное доказательство. Доказательство, основанное на ассоциации событий. Элемент «найди» в стратегии «найди, потеряй, перемести». См. также **Доказательство приобретения функции; Доказательство потери функции.**

Кортекс. Внешняя структура (в противоположность внутренней структуре медуллы).

Кортиев орган. Рецепторный орган в улитке внутреннего уха. Содержит волосковые клетки, которые находятся в заполненной жидкостью камере. Волны давления от движения жидкости в этой камере трансформируются волосковыми клетками в потенциалы действия, которые посылаются в мозг слуховым нервом и интерпретируются как звук.

Кортикальная пластинка. Слой клеток в развивающемся головном мозге млекопитающих, образованный нейронами в желудочковой зоне, мигрирующими по отросткам радиальной глии в положение около внешней поверхности мозга, где они будут образовывать шесть слоев неокортекса.

Кортикальная реакция. Процесс, лежащий в основе медленного блока полиспермии у многих видов животных, включая морских ежей и большинство млекопитающих. Осуществляется путем экзоцитоза кортикальных гранул яйца, содержащих ферменты, способствующие формированию оболочки оплодотворения, которая блокирует дальнейшее проникновение сперматозоидов. Завершается примерно через минуту после успешного слияния сперматозоида и яйцеклетки.

Кортикальная цитоплазма. Тонкий слой гелеобразной цитоплазмы, который лежит непосредственно под клеточной мембраной. В яйце содержит высокие концентрации молекул глобулярного актина, которые во время оплодотворения полимеризуются с образованием микрофиламентов и микроворсинок.

Кортикальные гранулы. Связанные с мембраной везикулярные структуры, формируемые в аппарате Гольджи и расположенные в кортексе яйца; содержат ферменты и другие компоненты. Экзоцитоз этих гранул при оплодотворении гомологичен экзоцитозу акросомы сперматозоида при акросомной реакции.

Костные морфогенетические белки (BMP). Члены суперсемейства белков TGF β . Первоначально идентифицированные по их способности вызывать образование костной ткани, BMP являются чрезвычайно многофункциональными, поскольку регулируют деление клеток, апоптоз, миграцию клеток и дифференцировку.

Кохлеовестибулярный ганглий. Ганглий, прилегающий к слуховому пузырьку. Формирует главную нервную связь между мозгом и структурами внутреннего уха.

Краниорахишизис. Врожденная патология, при которой нервная трубка не закрывается по всей длине.

Краниум. Череп позвоночного, состоящий из нейрокраниума (свод и основание черепа) и висцерокраниума (челюсти и другие производные глоточных дуг).

Крестообразный филлотаксис. У растений расположение боковых органов (например, листьев), при котором они располагаются супротивными парами, последовательно смещенными на 90°.

Крестцовый нервный гребень. Клетки нервного гребня, расположенные позади туловищного нервного гребня и, наряду с вагусным нервным гребнем, дающие начало парасимпатическим ганглиям кишечника, которые необходимы для перистальтического движения в кишечнике.

Крипта. Глубокая трубчатая выемка или ямка. Пример: кишечные крипты между кишечными ворсинками.

Кристаллины. Прозрачные, специфичные для хрусталика белки.

Кроветворение. См. Гемопоз.

Кровяные островки. Скопления гемангиобластов в висцеральной мезодерме. Обычно предполагается, что внутренние клетки кровяных островков становятся предшественниками клеток крови, тогда как внешние клетки становятся ангиобластами.

Кроссинговер. Обмен генетическим материалом во время мейоза, посредством которого гены из соседних хроматид обмениваются с гомологичными генами.

Крыша нервной трубки. Дорсальная область нервной трубки, имеющая большое значение для установления дорсально-вентральной полярности. Прилегающий эпидермис индуцирует экспрессию BMP4 в клетках крыши нервной трубки, что, в свою очередь, индуцирует каскад белков семейства TGF β в соседних клетках нервной трубки.

Ксилема. Проводящие каналы в сосудистых растениях для доставки воды и питательных веществ вверх через растение.

Куколка. Непитающаяся стадия голометаболического насекомого, следующая за личинкой последнего возраста; на стадии куколки насекомое проходит через метаморфоз, превращаясь из личинки во взрослую особь (имаго).

Кумулюс. Слой клеток, окружающих яйцо млекопитающего, состоящий из фолликулярных (гранулезных) клеток яичника, которые питают яйцо, пока оно не выйдет из яичника. Внутренний слой клеток кумулюса *corona radiata* выходит с яйцеклеткой при овуляции.

Купферов пузырьки. Временный заполненный жидкостью орган, содержащий реснички, устанавливающий лево-правую асимметрию у *Danio*.

Кэп-последовательность. См. Сайт инициации транскрипции.

Л

Лабioskротальные складки (уретральные складки). Складки, окружающие клоакальную мембрану, на индифференцированной стадии дифференцировки наружных

половых органов млекопитающих. Они сформируют половые губы у самки или мошонку у самца.

Ламеллоподии. Широкие локомоторные псевдоподии, содержащие сеть актиновых филаментов; обнаружены у мигрирующих клеток и на ростовых конусах нейронов.

Ламинин. Большой гликопротеин и основной компонент базальной пластинки; играет роль в сборке внеклеточного матрикса, способствует адгезии, росту, изменению формы и миграции клеток.

Ламповые щетки. Хромосомы в первичном ооците амфибии во время стадии диплотены профазы первого мейоза, которые растягивают большие петли ДНК, представляющие сайты интенсивного синтеза РНК.

Лануго. Первые волосы человеческих эмбрионов, как правило, выпадают до рождения.

Ларинготрахеальная бороздка. Выпячивание энтодермального эпителия в центре дна глотки, между четвертой парой глоточных карманов, которое удлиняется в вентральном направлении. Позже раздваивается и ветвится, образуя парные бронхи и легкие.

Латеральная мезодерма. См. **Мезодерма боковой пластинки.**

Латеральное торможение. Ингибирование клетки активностью соседней клетки.

Левозакрученность. Свойство раковин улиток, при котором устье располагается слева от раковины. См. также **Правозакрученность.**

Легоглобин. Кислородсодержащий белок, похожий на гемоглобин, содержится в фиксирующих азот корневых клубеньках бобовых. Это белок растений, экспрессию которого индуцируют симбиотические бактерии. Защищает фермент нитрогеназу от инактивации кислородом.

Лепестки. Негенеративные нефотосинтезирующие модифицированные листья в цветке покрытосеменных. Часто ярко окрашены и могут привлекать к цветку насекомых-опылителей.

Лептотена. В пер. с греч. — тонкая нить. Первая стадия профазы I деления мейоза, на которой хроматин растянут так, что невозможно идентифицировать отдельные хромосомы. Репликация ДНК уже произошла, и каждая хромосома состоит из двух параллельных хроматид.

Лиганд. Молекула, секретируемая клеткой, которая, связываясь с рецептором, вызывает ответ в другой клетке.

Лидерная последовательность. См. **5'-Нетранслируемая область.**

Лимфатическая сосудистая сеть. Сосуды циркуляторной системы, которые транспортируют лимфу (в отличие от кровеносных сосудов).

Лимфоидная ткань кишечника млекопитающих (GALT). Лимфоидная ткань, которая опосредует иммунитет слизистой оболочки и оральную иммунную толерантность, позволяя млекопитающим есть пищу без создания иммунного ответа на нее. Кишечный микробиом имеет решающее значение для созревания лимфоидной ткани кишечника.

Лиссэнцефалия. Отсутствие в коре головного мозга складок, как у мышей. Сравните с **Гирэнцефалия.**

Лицевой череп. Челюсти и другие скелетные элементы, формирующиеся из глоточных дуг.

Личинка. Незрелая и зачастую самая долгая стадия организма, часто значительно отличающаяся от взрослой, используемая для питания или расселения.

Лопастеперые рыбы. Рыбы с лопастными плавниками, включая целокантовых (латимерия) и двоякодышащих рыб. Четвероногие произошли от лопастеперых предков.

Лофотрохозои. Одна из двух основных групп первичноротых, многие из которых характеризуются спиральным дроблением и трохофорной личиночной формой. Разнообразная группа, включающая кольчатых червей (например, дождевых червей), моллюсков (например, улиток) и плоских червей (например, планарию). См. также **Экдизозои.**

Лучеперые рыбы (Actinopterygii). Рыбы с лучистыми плавниками; включают Костистых рыб (Teleostei).

Люмен. Полость внутри любой трубчатой или шаровидной структуры или органа.

Лютеинизирующий гормон (ЛГ). Гормон, секретируемый гипофизом млекопитающих; стимулирует выработку стероидных гормонов, например эстрогена клетками гранулезы в яичнике и тестостерона клетками Лейдига в семеннике. Повышение уровня ЛГ готовит фолликул к овуляции и приводит к тому, что первичный ооцит завершает мейоз I.

М

Макромеры. Более крупные клетки, возникающие в результате асимметричного деления дробления, например четыре большие клетки, появляющиеся при четвертом делении дробления эмбриона морского ежа, когда вегетативный ярус бластомеров подвергается неравномерному экваториальному делению.

Максимальная продолжительность жизни. Максимальное число лет, в течение которых особи данного вида выживают, характерное для этого вида. Сравни с **Ожидаемая продолжительность жизни.**

Маленькие макромеры. Скопление клеток, образующихся при пятом делении дробления на вегетативном полюсе эмбриона морского ежа в результате деления макромеров.

Мантийная зона (промежуточная зона). Второй слой развивающегося спинного мозга и продолговатого мозга, который формируется вокруг исходной нервной трубки. Содержит тела нервных клеток и имеет сероватый вид, поэтому будет образовывать серое вещество.

Маргинальная зона. (1) Третья, самая внешняя зона развивающегося спинного и продолговатого мозга, бедная клетками и состоящая преимущественно из аксонов нейронов мантийной зоны. Сформирует белое вещество, когда глиальные клетки покроют аксоны миелиновыми оболочками, имеющими беловатый вид. (2) У амфибий это экваториальная область бластулы между анимальным и вегетативным полушариями. (3) В гастралах

птиц и рептилий — тонкий слой клеток (краевой пояс) между *area pellucida* и *area opaca*, важный для детерминации потенциала клеток в раннем развитии.

Мастер-регулятор. Фактор транскрипции, который может контролировать дифференцировку клеток; (1) экспрессируется, когда начинается спецификация типа клеток; (2) регулирует экспрессию генов, специфичных для данного типа клеток; (3) способен перенаправлять развитие клетки к этому типу.

Материнская мРНК. Транскрипт, который либо синтезируется в первичном ооците и хранится в цитоплазме, либо синтезируется в питающих клетках и затем транспортируется в цитоплазму яйца. Первичный ооцит диплоиден, как и любые окружающие его питающие клетки. Следовательно, мРНК производится из материнского генома.

Материнский вклад. Хранящиеся в цитоплазме яйца мРНК и белки, продуцируемые материнским геномом на стадии первичного ооцита. См. также **Материнская мРНК**.

Материнский эффект. Эффект, возникающий во время эмбрионального развития; контролируется генными продуктами, которые накопились в яйце, пока оно находилось в яичнике; Эти генные продукты получены с использованием материнского генома посредством транскрипции гена либо в самом яйце, до того как оно созрело, либо в питающих клетках, которые транспортируют их в яйцо. См. **Материнская мРНК**.

Материнско-зиготический переход. Стадия эмбриона, когда материнские мРНК деградируют и контроль развития передается собственному геному зиготы; часто происходит на стадии средней бластулы. Наблюдается у многих разных групп животных.

Маточный цикл. Компонент менструального цикла, функция которого состоит в том, чтобы обеспечить подходящую среду для развивающейся бластоцисты.

Матриксные металлопротеиназы. См. **Металлопротеиназы**.

Матричная РНК (мРНК). РНК, кодирующая белок и покидающая ядро после процессинга, в ходе которого удаляются некодирующие участки и модифицируются концы молекулы.

Мегаспорангий. Структура, в которой образуются мегаспоры.

Мегаспоры. Гаплоидные клетки, полученные из диплоидной материнской клетки. По крайней мере одна из этих четырех клеток производит женский гаметофит, который производит яйцеклетку.

Медианная шарнирная точка. Клетки по средней линии нервной пластинки птиц и млекопитающих, которые привязываются к хорде и образуют шарнир, формирующий борозду на дорсальной средней линии и помогающий сгибать нервную пластинку для образования нервной трубки.

Медиатор транскрипции. Большой мультимерный комплекс из почти 30 белковых субъединиц, который во многих генах служит связующим звеном между РНК-полимеразой II (связанной с промотором) и эн-

хансерной последовательностью, образуя на промоторе комплекс преинициации.

Медленный блок полиспермии. См. **Кортикальная реакция**.

Медулярный шнур. Структура, образующаяся в каудальной области эмбриона птицы в процессе вторичной нейруляции в результате конденсации мезенхимных клеток и последующего мезенхимно-эпителиального перехода. Позже кавитирует и формирует каудальный отдел нервной трубки.

Межпальцевая некротическая зона. Зона запрограммированной гибели клеток в развивающейся конечности четвероногих, которая разделяет пальцы; если клетки в этой зоне не умирают, между пальцами остается перепонка, как на утиной лапе.

Мезентодерма. Зачаток, развивающийся в мезодерму и энтодерму. Синоним **Энтomezодерма**.

Мезенхима. Неплотная эмбриональная соединительная ткань, состоящая из разрозненных фибробластоподобных и иногда мигрирующих мезенхимных клеток, разделенных большим количеством внеклеточного матрикса.

Мезенхимо-эпителиальный переход (MET). Трансформация мезенхимных клеток в эпителиальные. Происходит, например, во время формирования сомитов из пресомитной мезодермы. См. также **Эпителио-мезенхимный переход**.

Мезенхимные клетки. Несвязанные или слабо связанные клетки, которые могут действовать как независимые миграционные единицы. Сравните с **Эпителиальные клетки**.

Мезенхимные стволовые клетки (MSC, стволовые клетки костного мозга). Мультипотентные стволовые клетки, которые происходят из костного мозга; способны давать начало многочисленным типам клеток костей, хрящей, мышц и жира.

Мезодерма. От греч. «мезо» — между. Средний из трех зародышевых листков, лежащий между эктодермой и энтодермой. Мезодерма дает начало мышцам и скелету, соединительной ткани, мочеполовой системе (почки, половые железы и их протоки), крови, сосудам и большей части сердца.

Мезодерма боковой пластинки (латеральная мезодерма). Мезодермальный лист, расположенный латерально к промежуточной мезодерме. Дает начало костям конечностей, соединительной ткани почек конечностей, сердечно-сосудистой системе (сердце, кровеносные сосуды и клетки крови), мышцам и соединительным тканям пищеварительного и дыхательного трактов, а также выстилке кишечника и его производных. Кроме того, участвует в формировании внезародышевых оболочек.

Мезодермальная мантия. Клетки, проникающие через вентральную и боковые губы бластопора во время гастрюляции амфибий и образующие сердце, почки, кости и части некоторых других органов.

Мезомеры. Восемь одинаковых анимальных бластомеров 16-клеточного зародыша морского ежа, образо-

вавшиеся в результате равномерного меридионального деления четырех анимальных бластомеров.

Мезонефрический проток. См. **Вольфов проток**.

Мезонефрос. Вторичная почка эмбрионов амниот, индуцированная в прилегающей мезенхиме средней частью нефрического (вольфова) протока. Непродолжительное время функционирует, фильтруя мочу у некоторых видов млекопитающих, а мезонефрические каналы образуют протоки, через которые сперматозоиды попадают из яичка в уретру (эпидидимис и семявыносящий проток). Образует взрослую почку анамний (рыб и амфибий).

Мезэнтобласт. Бластомер 4d у эмбрионов улитки, потомство которого приводит к образованию большинства мезодермальных (сердце, почка и мышцы) и энтодермальных (кишечная трубка) структур.

Мезэнцефалон (средний мозг). Средний пузырек развивающегося мозга позвоночных; основные производные включают четверохолмие и покрывку мозга. Его просвет становится водопроводом мозга.

Мейоз. Уникальный процесс деления, который у животных происходит только в половых клетках, позволяет уменьшить количество хромосом до гаплоидного набора. Все остальные клетки делятся с помощью митоза. Мейоз отличается от митоза тем, что (1) клетки подвергаются двум клеточным делениям без промежуточного периода репликации ДНК и (2) гомологичные хромосомы (каждая из которых состоит из двух сестринских хроматид, соединенных вместе в области кинетохора) спариваются и рекомбинируют генетический материал.

Меланобласты. Предшественники пигментных клеток.

Меланоциты. Клетки, содержащие пигмент меланин. Происходят из клеток нервного гребня, которые подвергаются обширной миграции во все области эпидермиса.

Мелтрины. Набор металлопротеиназ, участвующих в событиях слияния клеток, например слиянии миоцитов с образованием миофибрилл и макрофагов с образованием остеокластов. См. также **Металлопротеиназы**.

Меридиональный. Деление дробления, перпендикулярное экваториальной плоскости.

Меристема. Ткань в растениях, содержащая недифференцированные и активно делящиеся клетки, формирующая новые растительные ткани. Различные типы меристем формируют различные структуры растения. Основными меристемами считают верхушечную и корневую апикальную меристему.

Меристема соцветия. Меристема, развивающаяся из апикальной меристемы побега, когда растение начинает цвести; меристема соцветия производит меристемы цветка, которые образуют пестики, тычинки, лепестки и чашелистики каждого цветка. См. **Меристема**.

Меробластическое дробление. От греч. «мерос» — часть. Тип дробления яиц, содержащих большое количество желтка, при котором делению подвергается только часть цитоплазмы. Борозда дробления не проникает в желточную часть цитоплазмы, потому что желточные пластинки препятствуют образованию там мембран. Дробится только часть яйца, предназначенная

стать зародышем, а другая часть — желток — служит источником питательных веществ. Характерно для насекомых, рыб, рептилий и птиц.

Мероистический оогенез. Тип оогенеза, обнаруженный у некоторых насекомых (включая *Drosophila*), при котором между клетками-потомками оогонии остаются цитоплазматические связи.

Метазои. Многоклеточные животные.

Металлопротеиназы (матриксные металлопротеиназы). Ферменты, которые расщепляют компоненты внеклеточного матрикса и играют важную роль в процессах ремоделирования тканей при заболеваниях и в развитии, включая метастазирование, ветвящийся морфогенез эпителиальных органов, отслойку плаценты при рождении и артрит.

Метаморфическая линька. Линька на куколку. Линька личинки последнего возраста голометаболических насекомых, в результате которой она становится куколкой.

Метаморфоз. Переход от одной формы к другой, например превращение личинки во взрослое насекомое или головастика в лягушку.

Метаморфозный климакс. Период серьезных метаморфических изменений у земноводных, когда происходит резорбция хвоста и жабер и ремоделирование кишечника. В этот период резко возрастает концентрация тироксина, а уровень его рецептора TR β достигает максимума.

Метанефрическая мезенхима. Мезенхима, происходящая из задних областей промежуточной мезодермы, участвующая в мезенхимо-эпителиальных взаимодействиях, которые формируют метанефрическую почку и образуют секреторные нефроны.

Метанефрическая почка. См. **Матанефрос**.

Метанефрогенная мезенхима. См. **Метанефрическая мезенхима**.

Метанефрос (метанефрическая почка). Третичная почка эмбрионов и постоянная почка взрослых амниот.

Метастазы. Инвазии раковых клеток в другие ткани.

Метафазная пластинка. Структура, появляющаяся во время митоза или мейоза, в которой хромосомы прикреплены своими кинетохорами к веретену микротрубочек и выстроены в плоскость между двумя полюсами клетки. Если метафазная пластинка образуется посередине между двумя полюсами, деление будет симметричным; если ближе к одному полюсу, оно будет асимметричным и образуются одна большая и одна меньшая клетки.

Метилирование гистонов. Добавление метильных групп к гистонам. Может активировать или дополнительно подавлять транскрипцию в зависимости от метилированной аминокислоты и присутствия других метильных или ацетильных групп в непосредственной близости.

Метилирование ДНК. Способ контроля уровня транскрипции генов у позвоночных путем ферментативного метилирования промоторов неактивных генов. Некоторые остатки цитозина, за которыми следуют остатки гуанозина, метилированы, и полученный метилцитозин стабилизирует нуклеосомы и предотвращает связывание

факторов транскрипции. Имеет важное значение для инактивации X-хромосомы и геномного импринтинга.

Метилирование. См. **Метилирование гистонов.**

Метэнцефалон (задний мозг). Переднее подразделение ромбэнцефалона; дает начало мозжечку (координирует движения, позу и равновесие) и мосту (отдел, связывающий области мозга).

Механическая анизотропия. Наличие различий в механических свойствах (например, растяжимость) вдоль разных осей.

Миелиновая оболочка. Модифицированная плазматическая мембрана олигодендритов (в ЦНС) или шванновских клеток (в периферической нервной системе); окружает аксоны нервных клеток, обеспечивая изоляцию, которая удерживает и ускоряет электрические импульсы, передаваемые вдоль аксонов.

Миелэнцефалон (продолговатый мозг). Заднее подразделение ромбэнцефалона; становится продолговатым мозгом.

Микориза. Грибы, которые образуют симбиотические отношения с растениями, оплетая их корни. Пока растение снабжает гриб сахарами, гриб поглощает воду и минеральные вещества из почвы.

Микроворсинки. Небольшие отростки на поверхности клеток, содержащие микрофиламенты; например, микрофиламенты на поверхности яйцеклетки во время оплодотворения могут способствовать слиянию со сперматозоидом.

Микроглия. Маленькие глиальные клетки центральной нервной системы, которые выполняют иммунную функцию, поглощая умирающие и дисфункциональные нейроны и глию.

Микромеры. Мелкие клетки, возникающие в результате асимметричного деления дробления, например четыре микромера, появляющиеся при четвертом делении дробления эмбриона морского ежа, когда вегетативный ярус бластомеров подвергается неравномерному экваториальному делению.

Микропиле. Отверстие в хорионе (вторичной оболочке), которое позволяет проходить через него только одному сперматозоиду за раз; у *Drosophila* расположено в будущей дорсальной передней области эмбриона.

МикроРНК (miRNA). Малые (около 22 нуклеотидов) РНК, комплементарные участку определенной мРНК; регулируют трансляцию этого транскрипта. МикроРНК обычно связываются с 3'-UTR мРНК и ингибируют их трансляцию.

Микроспорангий. Участки внутри пыльника, где образуются микроспоры.

Микроспоры. Гаплоидные клетки растений, которые развиваются в пыльцевую трубку (мужской гаметофит).

Микрофиламенты. Длинные нити полимеризованного актина, основной компонент цитоскелета. В сочетании с миозином образует сократительные волокна, необходимые для цитокинеза; при оплодотворении образуются в кортексе яйца для удлинения микроворсинок;

с помощью других молекул присоединяются к трансмембранным молекулам адгезии, таким как кадгерины и интегрины.

Микрофтальмический фактор транскрипции (MITF). Фактор транскрипции, необходимый для спецификации меланобластов и синтеза пигмента. Мутация в гене этого фактора транскрипции приводит к формированию аномально маленьких глаз (микрофтальмия) у мышей.

Микрошпицы. Необходимые нейрону для поиска пути, содержащие микрофиламенты остроконечные филоподии конуса роста, которые удлиняются и сокращаются, обеспечивая миграцию аксонов. Микрошпицы чувствуют микроокружение и посылают сигналы обратно в тело нейрона.

Миобласты. Клетки-предшественники мышц.

Миоволокна. См. **Мышечные волокна.**

Миогенин. Миогенный регуляторный фактор, который регулирует несколько генов, участвующих в дифференцировке и репарации клеток скелетных мышц. См. также **Миогенные регуляторные факторы.**

Миогенные регуляторные факторы. Основные факторы транскрипции типа спираль-петля-спираль (такие как MyoD, Myf5 и миогенин); являются важными регуляторами развития мышц.

Миокард. Сердечная мышца.

Миостатин. Член семейства TGF β , негативно регулирующий развитие мышц. Генетические дефекты в этом гене или его негативная регуляторная микроРНК вызывают развитие огромных мышц у некоторых млекопитающих, включая людей.

Миотом. Часть сомита, дающая начало всем скелетным мышцам тела позвоночных, за исключением тех, которые находятся в голове. Миотом состоит из двух компонентов: примаксиального компонента, ближайшего к нервной трубке, который формирует мускулатуру спины и грудной клетки, и абаксиального компонента, дальше от нервной трубки, которая формирует мышцы конечностей, и брюшная стенка тела.

Миоэпителий. Эпителий, клетки которого обладают характеристиками как эпителиальных, так и мышечных клеток, например два эпителиальных слоя гидры.

Многоклеточность. См. **Многоклеточный эукариотический организм.**

Многоклеточный эукариотический организм. Эукариотический организм с множеством клеток, которые остаются вместе как функциональное целое; последующие поколения образуют такие же цельные особи, состоящие из множества клеток. (Для растений, грибов и животных.)

Модель зоны прогресса. Модель проксимально-дистальной спецификации конечности, которая постулирует, что каждая клетка мезодермы специфицируется длительностью времени, которое она проводит, делясь в зоне прогресса. Чем дольше клетка проводит в зоне прогресса, тем больше митозов она претерпевает и тем более дистально специфицируется.

Модель раннего выделения и расширения предшественников. Модель проксимально-дистальной спецификации конечности, в которой клетки всего раннего зачатка конечности уже специфицированы, и последующие клеточные деления просто расширяют эти клеточные популяции. Сравни с **Модель зоны прогресса**.

Модель Тьюринга. См. **Реакционно-диффузионный механизм**.

Модельные системы. Виды, которые легко содержатся в лабораторных условиях и обладают особыми свойствами, позволяющими легко наблюдать механизмы их развития (например, морские ежи, *Drosophila*, *C. elegans*, *Danio* и мыши).

Модуль. Дискретная единица роста, характеризующаяся в большей степени внутренней, чем внешней интеграцией.

Модульность. Принцип теории систем, в котором организм рассматривают как систему дискретных и взаимодействующих модулей.

Мозаичная плейотропия. Независимая экспрессия гена в нескольких тканях. Каждая ткань нуждается в продукте этого гена и в его отсутствие не развивается нормально.

Мозаичные зародыши. Эмбрионы, в которых большинство клеток определяются с помощью автономной спецификации и каждая клетка получает свои инструкции независимо и без межклеточных взаимодействий.

Молекулы клеточной адгезии. Молекулы адгезии, которые удерживают клетки вместе. Основная группа — кадгерины. См. также **Кадгерины**.

Молекулярная экономия. Теоретический принцип, согласно которому в разных процессах развития у разных видов используются одни и те же типы молекул («маленький инструментарий»). «Инструментарий» включает факторы транскрипции, паракринные факторы, молекулы адгезии и каскады трансдукции сигналов, которые очень похожи у разных организмов.

Монозиготные близнецы (однойяйцевые близнецы). В пер. с греч. — одно яйцо. Генетически «идентичные» близнецы; образуются, когда клетки одного раннего дробящегося эмбриона разделяются надвое — либо путем разделения ранних бластомеров, либо путем разделения внутренней клеточной массы на две области в пределах одной и той же бластоцисты. Сравните с **Дизиготные близнецы**.

Моноспермия. Оплодотворение яйцеклетки одним сперматозоидом, в результате которого два гаплоидных ядра образуют диплоидное ядро оплодотворенной яйцеклетки (зиготы), восстанавливая таким образом количество хромосом, характерное для данного вида.

Морула. В пер. с греч. — тутовая ягода. Эмбрион позвоночных из 16–64 клеток; предшествует стадии бластулы или бластоцисты. Морула млекопитающих на стадии 16 клеток состоит из небольшой группы внутренних клеток (которые сформируют внутреннюю клеточную массу), окруженных большой группой внешних клеток (которые формируют трофобласт).

Морфа (экоморфа). Один из нескольких различных фенотипов, способных возникнуть под влиянием экологических условий.

Морфаллаксис. Тип регенерации, который происходит путем переорганизации существующих тканей с небольшим вкладом нового роста (например, регенерация гидры).

Морфаллактическая регенерация. См. **Морфаллаксис**.

Морфогенез. Организация клеток организма в функциональные структуры посредством скоординированного роста, миграции и гибели клеток.

Морфогенетические детерминанты. Факторы транскрипции или их мРНК, которые влияют на развитие клетки.

Морфогены. В пер. с греч. — дающие форму. Диффундирующие биохимические молекулы, которые могут определять путь развития клетки в зависимости от их концентрации; в клетках, подвергшихся воздействию высоких и низких концентраций морфогена, активируются разные наборы генов.

Морфолино. Антисмысловые олигонуклеотиды против мРНК; используются для экспериментального подавления экспрессии белка.

Мочеполовой синус. У млекопитающих — область клоаки, отделенная от прямой кишки мочеполовой перегородкой. Мочевой пузырь формируется из передней части синуса, а уретра — из задней области. Также образует преддверные железы у женщин и предстательную железу у мужчин.

мРНК. См. **Матричная РНК**.

Мужской пронуклеус. Гаплоидное ядро сперматозоида.

Мультипотентность. Способность стволовой клетки генерировать различные типы клеток с ограниченной специфичностью для ткани, в которой они находятся. Пример: большинство стволовых клеток в органах взрослых животных являются мультипотентными.

Мультипотентные клетки-предшественники сердца. Клетки-предшественники поля сердца, которые формируют кардиомиоциты, эндокард, эпикард и волокна Пуркинье.

Мультипотентные стволовые клетки. Постнатальные стволовые клетки, потенции которых ограничены относительно небольшим подмножеством всех возможных типов клеток организма. (Согласно более точному определению, мультипотентные стволовые клетки способны к дифференцировке в клетки — производные одного зародышевого листка. — *Прим. ред. перевода*.)

Мутовка. У растений набор листьев, чашелистников, лепестков или ветвей, расположенных в соответствии с мутовчатым филотаксисом. См. **Мутовчатый филлотаксис**.

Мутовчатый филлотаксис. Расположение боковых органов у растений, при котором набор органов (3 или более) появляется одновременно в кольце вокруг стебля или вершины.

Мутуализм. Форма симбиоза, в которой отношения приносят пользу обоим партнерам.

Мышечные волокна (миоволокна). Многоядерные мышечные клетки скелетных мышц, которые образуются в результате слияния миобластов.

Мюллеров ингибирующий фактор. См. **Антимюллеров гормон**.

Мюллеров проток (парамезонефрический проток). Проток, проходящий латерально к мезонефрическому протоку как у мужских, так и у женских эмбрионов млекопитающих. Регрессируют у плода мужского пола, но образуют яйцеводы, матку, шейку матки и верхнюю часть влагалища у плода женского пола. Сравните с **Вольфов проток**.

Мюллеровские клетки. См. **Глиальные клетки Мюллера**.

Н

Надкостница. Фиброзная оболочка, содержащая соединительную ткань, капилляры и клетки-предшественники костей, которая покрывает развивающуюся и взрослую кость.

Надхрящница. Соединительная ткань, которая окружает большую часть хряща, кроме суставов.

Наивное плюрипотентное состояние. Наиболее незрелое недифференцированное состояние эмбриональных стволовых клеток с наибольшим потенциалом плюрипотентности.

Наивные эмбриональные стволовые клетки. Самые незрелые эмбриональные стволовые клетки с наибольшим потенциалом плюрипотентности. См. также **Праймированные эмбриональные стволовые клетки** и **Эмбриональные стволовые клетки**.

Наивный. Интактный, исходный, без опыта.

Наружная радиальная глия. Клетки-предшественники, которые находятся в субвентрикулярной зоне головного мозга и дают начало промежуточным клеткам-предшественникам.

Наследственность с изменчивостью. Теория Дарвина, объясняющая единство типа происхождением от общего предка и адаптацией к условиям конкретной среды путем естественного отбора.

Начальные клетки. Тотипотентные стволовые клетки, созданные ранним эмбрионом растения; есть две группы начальных клеток: апикальная меристема побега и корневая апикальная меристема.

Невропор. Два открытых конца (передний и задний невропоры) нервной трубки, которые позже закрываются.

Негативная обратная связь. Процесс, продукт которого ингибирует более раннюю стадию процесса.

Недифференцированная зона. См. **Зона прогресса**.

Неинволюирующая маргинальная зона. Область клеток на внешней стороне гастролы амфибии, которая не инволюирует. Вместе с клетками анимальной шапочки эпиболруют и покрывают весь эмбрион, образуя поверхностную эктодерму.

Нейральная сетчатка. См. **Нейросетчатка**.

Нейральные стволовые клетки. Стволовые клетки центральной нервной системы, которые способны к ней-

рогенезу на протяжении всей жизни. У позвоночных сохраняют большую часть свойств своей эмбриональной клетки-предшественника, клетки радиальной глии.

Нейральный ограничительный сайленсерный фактор (NRSF). Фактор транскрипции с цинковым пальцем, который связывает нейральный ограничительный сайленсерный элемент и экспрессируется в каждой клетке, которая не является зрелым нейроном.

Нейральный ограничительный сайленсерный элемент (NRSE). Регуляторная последовательность ДНК, обнаруженная в нескольких генах мышцы, которая предотвращает активацию промотора в любой ткани, кроме нейронов, ограничивая экспрессию этих генов нервной системой.

Нейробласт. Незрелая делящаяся клетка-предшественник, которая может дифференцироваться в клетки нервной системы.

Нейрокраниум. Свод и основание черепа.

Нейромедиаторы. См. **Нейротрансмиттеры**.

Нейромезодермальные предшественники. У эмбрионов позвоночных — популяция мультипотентных клеток-предшественников, способных вносить вклад как в нервную трубку, так и в параксиальную (сомитную) мезодерму, обнаруженная в самой задней (каудальной) области эмбриона.

Нейромезодермальный. Дающий начало как нервным, так и сомитным типам клеток. См. **Нейромезодермальные предшественники**.

Нейроны. Нервные клетки, специализирующиеся на восприятии и передаче информации с помощью электрических и химических сигналов.

Нейроны Пуркинье. Крупные, разветвленные нейроны, которые являются основным типом клеток мозжечка.

Нейросетчатка (нейральная сетчатка). Многослойная структура, производное внутреннего слоя глазного бокала, включающая светочувствительные и цветочувствительные фоторецепторные клетки (палочки и колбочки), тела ганглиозных клеток, биполярные интернейроны (передают электрические импульсы от палочек и колбочек к ганглиозным клеткам), глиальные клетки Мюллера, амакринные нейроны (у которых нет длинных аксонов) и горизонтальные нейроны (передают электрические импульсы в плоскости сетчатки). См. также **Пигментный эпителий сетчатки**.

Нейротрансмиттеры (нейромедиаторы). Молекулы (например, ацетилхолин, ГАМК, серотонин), секретирующиеся на концах аксонов. Эти молекулы пересекают синаптическую щель и воспринимаются соседним нейроном, передавая таким образом нервный сигнал. См. также **Синапс**.

Нейротропин. См. **Нейротрофин**.

Нейротрофин (нейротропин). Факторы роста, поддерживающие жизнедеятельность нейронов. **Нейротрофический** (в пер. с греч. — питающий) относится к способности фактора поддерживать жизнедеятельность нейрона, как правило, путем обеспечения факторами роста. **Нейротропный** (в пер. с греч. — поворот) относится к веществу, которое притягивает или оттал-

кивает нейроны. Поскольку многие факторы имеют оба свойства, эти термины используют параллельно; в более поздней литературе предпочтение отдается термину «нейротрофин». См. также **Фактор роста нервов; Нейротрофический фактор мозга; Консервативный дофаминовый нейротрофический фактор (CDNF); Нейротрофины 3 и 4/5.**

Нейротрофины 3 и 4/5 (NT3, NT4/5). Нейротрофические факторы. Нейротрофин 3 привлекает сенсорные нейроны ганглиев дорсальных корешков; нейротрофин 4/5 привлекает лицевые двигательные нейроны и клетки мозжечковых гранул.

Нейротрофический фактор мозга (BDNF). Паракринный фактор, который регулирует активность нейронов и, по-видимому, является критическим для формирования синапсов, вызывая локальную трансляцию нейронных транскриптов в дендритах. BDNF необходим для выживания определенной разновидности нейронов в полостном теле (область мозга, контролирующая движения).

Нейрула. Эмбрион во время нейруляции (т. е. в процессе формирования нервной трубки).

Нейруляция. Процесс складывания нервной пластинки и закрытия краниального и каудального невропоры с образованием нервной трубки.

Некроз. Патологическая гибель клеток, вызванная такими факторами, как воспаление или токсическое повреждение. Сравните с **Апоптоз**.

Некротические зоны. Области конечности, которые формируются с помощью апоптотической (запрограммированной) гибели клеток; термин «некротическая» зона является пережитком времени, когда не делали различий между некрозом и апоптозом. Различают четыре некротические зоны — межпальцевую, переднюю, заднюю и внутреннюю.

Неокортекс. Слой серого вещества в головном мозге, который является отличительной чертой мозга млекопитающих; в неокортексе различают шесть слоев тел нейронов, каждый из которых обладает определенными функциональными свойствами.

Неотения. Сохранение ювенильной формы тела в течение всей жизни, в то время как половые клетки и репродуктивная система созревают. Пример: мексиканский аксолотль. См. также **Прогенез**.

Непротиворечивость. См. **Связность**.

Непрямое развитие. Эмбриональное развитие, включающее личиночную стадию с признаками, очень отличающимися от признаков взрослого организма, появляющихся только после метаморфоза.

Нервная бороздка. U-образная бороздка, которая образуется в центре нервной пластинки при первичной нейруляции.

Нервная пластинка. Область дорсальной эктодермы, которая специфицируется как нейроэктодерма. Позже складывается и становится нервной трубкой.

Нервная трубка. Эмбриональный предшественник центральной нервной системы (головной и спинной мозг).

Нервные валики. Утолщенные края нервной пластинки, которые во время нейруляции приподнимаются и смыкаются по средней линии, образуя нервную трубку.

Нервный гребень. Временная полоса клеток, возникающая из боковых краев нервной пластинки, которая соединяет нервную трубку с эпидермисом. Образует клеточную популяцию — клетки нервного гребня, которые во время формирования нервной трубки отделяются и мигрируют, порождая разнообразные типы клеток и структуры, включая сенсорные нейроны, кишечные нейроны, глию, пигментные клетки, а также кости и хрящи головы.

Нервный киль. Группа предшественников нервных клеток, которые собираются в результате конвергентных движений вдоль дорсальной срединной линии эпибласта эмбриона рыбы. Вовлекает аксиальную и параксиальную мезодерму и в конечном счете образует стержень ткани, который отделяется от эпидермальной эктодермы и формирует щелевидную полость, превращаясь в нервную трубку.

Несегментированная мезодерма. Полосы параксиальной мезодермы до их сегментации в сомиты.

Нескелетогенная мезенхима (вторичная мезенхима). Сформирована из яруса veg2 60-клеточного эмбриона морского ежа, дает начало пигментным клеткам, иммунцитам и мышечным клеткам.

Нетрины. Паракринные факторы, формирующие градиент, который направляет конусы роста аксонов. Играть важную роль в миграции аксонов комиссур и сетчатки. Netrin-1 секретируется вентральной пластинкой, Netrin-2 — нижней областью спинного мозга.

Нефрический проток. См. **Вольфов проток**.

Нефрон. Функциональная единица почки.

Нимфа. Личиночная стадия насекомых, напоминающая недоразвитое взрослое насекомое. Претерпевающая последовательные линьки, становится все более зрелым.

Ниша стволовых клеток. Среда (регуляторное микроокружение), обеспечивающая состав внеклеточного матрикса и паракринных факторов, который позволяет находящимся в ней клеткам оставаться относительно недифференцированными. Регулирует пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток.

Ниша стволовых клеток взрослого организма. Ниша, в которой находятся стволовые клетки взрослого организма и которая регулирует их самообновление, выживание и дифференцировку дочерних клеток, покидающих нишу.

Нодозные плакоды. Пара эпибранхиальных плакод у позвоночных; дают начало сенсорным компонентам X черепного (блуждающего) нерва, который иннервирует многие органы тела, такие как сердце, легкие и желудочно-кишечный тракт.

Норма реакции. Тип фенотипической пластичности, при котором геном кодирует потенциал для непрерывного диапазона потенциальных фенотипов; среда, с которой сталкивается индивид, определяет, в какой степени фенотип развивается. Сравните с **Полифенизм**.

Нуклеосома. Базовая единица структуры хроматина, состоящая из октамера гистоновых белков (две молекулы каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4), обернутая двумя петлями ДНК, содержащими приблизительно 147 пар оснований.

Ньюкуповский центр. Самые дорсальные вегетативные бластомеры бластулы амфибии, образованные в результате кортикальной ротации, инициированной вхождением сперматозоида в яйцеклетку; важный сигнальный центр на дорсальной стороне эмбриона. Одна из его основных функций — индукция дорсального организатора.

О

Обезогены. Вещества, увеличивающие продукцию и накопление жира и жировых клеток в организме. Некоторые эндокринные дизрапторы, в том числе DES и BPA, являются обезогенами.

Облигатный мутуализм. Симбиоз, при котором участники взаимозависимы друг от друга до такой степени, что ни один из партнеров не может выжить без другого.

Оболочка оплодотворения. Образуется из желточной оболочки яйца морского ежа после высвобождения кортикальных гранул. Гликозаминогликаны, выделяемые кортикальными гранулами, поглощают воду и расширяют перивителлиновое пространство между клеточной мембраной и оболочкой оплодотворения. См. **Кортикальная реакция.**

Обонятельные плакоды. Парные эпидермальные утолщения, которые формируют носовой эпителий (обонятельные рецепторы), а также ганглии обонятельных нервов.

Обратная генетика. Генетический подход отключения или подавления экспрессии гена в организме и последующего исследования возникающего фенотипа. Сравните с **Прямая генетика.**

Обратное развитие. Преобразование зрелой стадии организма в более юную стадию его жизненного цикла. Встречается у некоторых видов гидроидных, где взрослая половозрелая медуза может вернуться к стадии полипа.

Обусловленная спецификация (зависимая спецификация). Способность клеток достигать своего статуса путем взаимодействия с другими клетками. В этом случае то, чем станет клетка, в значительной степени определяют паракринные факторы, секретируемые ее соседями.

Овальное отверстие. Отверстие в перегородке между правым и левым предсердиями в сердце плода млекопитающих.

Овальные клетки. Популяция клеток-предшественников в печени, которые делятся и образуют новые гепатоциты и клетки желчных протоков, когда сами гепатоциты не способны в достаточной степени обеспечить регенерацию печени.

Овариола. Яйцевая камера *Drosophila*.

Овастацин. Протеаза, высвобождаемая из кортикальных гранул яиц млекопитающих после оплодотворения,

расщепляет ZP2 и тем самым препятствует проникновению сперматозоидов в яйцеклетку

Овуляция. Высвобождение яйцеклетки из яичника.

Ограничение калорий. Диетическое ограничение как средство продления срока жизни млекопитающих (в ущерб фертильности).

Ограничение развития. В эволюции ограничение числа и форм возможных фенотипов, которые могут быть созданы взаимодействиями, возможными между молекулами и модулями в развивающемся организме.

Однояйцевые близнецы. См. **Монозиготные близнецы.**

Ожидаемая продолжительность жизни. Период времени, в течение которого усредненная особь данного вида может выжить; характеристика популяции, а не вида.

Окостенение (оссификация). Смотрите **Остеогенез.**

Олигодендроглия. См. Олигодендроциты.

Олигодендроциты (олигодендроглия). Тип глиальных клеток в центральной нервной системе, которые обвиваются вокруг аксонов, образуя миелиновую оболочку.

Омфаломезентериальные вены (пупочные вены). Вены, которые образуются из кровяных островков желточного мешка. Доставляют питательные вещества к эмбриону млекопитающего и транспортируют газы к местам газообмена с матерью и обратно.

Онкогены. Регуляторные гены, которые способствуют делению клеток, уменьшают клеточную адгезию и предотвращают гибель клеток. Могут вызывать образование опухолей и метастазирование. Протоонкогены являются нормальной версией этих генов, которые при избыточной или неправильной экспрессии в результате мутаций или неправильного метилирования становятся онкогенами и могут привести к раку.

Оогенез. Развитие яйцеклетки, включая мейотические деления и созревание.

Оогонии. Клетки женской зародышевой линии животных, которые митотически делятся и затем превращаются в ооциты.

Ооцит. Развивающееся яйцо. Первичный ооцит находится на стадии роста, не прошел мейоз и имеет диплоидное ядро. Вторичный ооцит завершил свое первое мейотическое деление, но не второе, и гаплоиден.

Оплодотворение. Слияние мужской и женской гамет с последующим слиянием их гаплоидных ядер для восстановления полного набора хромосом, характерного для данного вида, и активация в цитоплазме яйца тех реакций, которые позволяют возобновить развитие.

Определение гонадного пола. См. **Первичное определение пола.**

Опухолевые ангиогенные факторы. Факторы, секретируемые микроопухолями (VEGF, Fgf2, плацентоподобный фактор роста и др.), которые стимулируют митоз в эндотелиальных клетках и направляют дифференцировку кровеносных сосудов, стимулируя их рост в направлении опухоли.

Опухолевые супрессоры. Регуляторные гены, чьи продукты защищают клетки от прогрессии в направле-

нии раковых. Могут ингибировать деление клеток или увеличивать адгезию между клетками; способны вызывать апоптоз быстро делящихся клеток. Рак может возникнуть в результате мутаций или неправильного метилирования, которые инактивируют гены опухолевых супрессоров.

Опыление. Процесс, посредством которого пыльцевые зерна перемещаются от мужского пыльника к женскому пестику этого или другого цветка.

Оральная пластинка. Область, где эктодерма стомодеума встречается с энтодермой первичной кишки. Позже прорывается и формирует ротовое отверстие.

Организатор (дорсальный организатор, шпемановский организатор, организатор Шпемана–Мангольд). У амфибий это клетки дорсальной губы бластопора и их производные (хорда и энтометодерма головы). Функционально эквивалентен гензеновскому узелку курицы, узелку млекопитающих, зародышевому щитку рыб. Устанавливает основной план строения тела раннего эмбриона.

Организатор Шпемана–Мангольд. См. **Организатор.**

Органогенез. Взаимодействие и перестройка клеток трех зародышевых листков с образованием тканей и органов.

Органоиды. Рудиментарные органы, обычно размером с горошину, выращенные в культуре из плюрипотентных стволовых клеток.

Ортологи. Гены разных видов, сходные по последовательности ДНК по причине того, что эти гены были унаследованы от общего предка. Сравните с **Паралоги.**

Оседание личинки. Способность морских личинок приостанавливать развитие до тех пор, пока они не испытают специфичный экологический сигнал для оседания.

Основная ткань. Любая ткань растений, которая не является покровной или проводящей; используется главным образом для хранения, опоры и фотосинтеза и включает заполняющую ткань, называемую паренхимой, и более плотные колленхиму и склеренхиму.

Основной фактор роста фибробластов (Fgf2). Один из трех факторов роста, необходимых для генерации гемангиобластов из висцеральной мезодермы. См. также **Ангиопоэтины**; **Факторы роста эндотелия сосудов (VEGF).**

Осификация. См. **Окостенение.**

Остеобласты. Коммитированные клетки-предшественники кости.

Остеогенез. Формирование костей; превращение мезенхимы в костную ткань путем перехода от остеокласта к остеоблиту. См. **Эндохондральное окостенение**; **Интрамембранозное окостенение.**

Остеоидный матрикс. Межклеточный матрикс, секретируемый остеобластами, способный связывать кальций.

Остеокласты. Многоядерные клетки, происходящие из линии клеток крови, которые проникают в кости через кровеносные сосуды и разрушают костную ткань в процессе ремоделирования.

Остеоциты. Костные клетки. Происходят из остеобластов, которые внедряются в кальцифицированный остеоидный матрикс.

Ответчик. Ткань, которая индуцируется во время индукции. Клетки отвечающей ткани должны иметь рецепторы для индуцирующих молекул и быть способными реагировать на индуктор. См. **Компетентность.**

Отслеживание пути клеток. Отслеживание пути клеток во время развития. Эмбриональные клетки могут быть экспериментально помечены и путь их потомков отслежен вплоть до стадии личинки или взрослого организма; позволяет разработать карту презумптивных зачатков. См. также **Карта презумптивных зачатков.**

П

Палочки. Фоторецепторы в нейросетчатке глаза позвоночных, которые более чувствительны к слабому освещению, чем колбочки. Они содержат только один светочувствительный пигмент и поэтому не передают информацию о цвете.

Паразитизм. Тип симбиоза, при котором один партнер получает выгоду в ущерб другому.

Паракринная сигнализация. Передача сигналов между клетками, которая происходит на больших расстояниях посредством секреции паракринных факторов в межклеточное пространство.

Паракринное взаимодействие. Взаимодействие, при котором белки, синтезируемые одной клеткой, диффундируют на расстояние, вызывая изменения в соседних клетках.

Паракринный фактор. Секретируемый диффундирующий белок, который обеспечивает сигнал, взаимодействующий с соседними клетками и изменяющий их поведение.

Параксиальная мезодерма (сомитная мезодерма). Толстые полосы эмбриональной мезодермы, непосредственно прилегающие к нервной трубке и хорде. В туловище параксиальная мезодерма дает начало сомитам, в голове она (наряду с нервным гребнем) дает начало скелету, соединительным тканям и мускулатуре лица и черепа.

Параксиальный протокадгерин. Белок адгезии, специфически экспрессируемый в параксиальной (сомитной) мезодерме во время гаструляции амфибий; необходим для конвергентного растяжения.

Паралоги. Гены, которые похожи по последовательности, по причине того, что они являются результатом дупликации генов у предкового вида. Сравните с **Ортологи.**

Парамезонефрический проток. См. **Мюллеров проток.**

Парасегмент. «Трансsegmentная» единица тела *Drosophila*, которая включает задний отдел одного сегмента и передний отдел следующего сегмента; представляется фундаментальной единицей экспрессии эмбриональных генов.

Парасимпатические ганглии (кишечные). Ганглии парасимпатической («отдыхайте и переваривайте») нерв-

ной системы, которые происходят из клеток вагусного и крестцового нервного гребня.

Париетальная мезодерма. Слой боковой мезодермы, ближайший к эктодерме, и отделенный от висцеральной латеральной мезодермы целомиической полостью. Вместе с вышележащей эктодермой соматическая мезодерма образует соматоплевру, которая будет формировать стенку тела. Соматическая мезодерма является также частью выстилки целома. Не путать с сомитной (параксиальной) мезодермой.

Париетальная энтодерма. Клетки первичной энтодермы, которые контактируют с трофобластом эмбриона млекопитающих. См. **Первичная энтодерма**.

Партеногенез. В пер. с греч. — девственное рождение. Развитие из яйцеклетки, активированной в отсутствие сперматозоида. У многих беспозвоночных и некоторых позвоночных может происходить нормальное партеногенетическое развитие.

Паттернирование. См. Разметка.

Пахитена. В пер. с греч. — толстая нить. Третья стадия профазы I деления мейоза, во время которой хроматиды утолщаются и укорачиваются и различаются с помощью световой микроскопии как отдельные хроматиды. На этом этапе происходит кроссинговер.

Первичная бороздка. Углубление вдоль первичной полосы, которое является местом, через которое мигрирующие клетки проходят в глубокие слои эмбриона.

Первичная мезенхима. См. **Скелетогенная мезенхима**.

Первичная нейруляция. Процесс формирования передней части нервной трубки. Клетки, окружающие нервную пластинку, заставляют клетки нервной пластинки пролиферировать, инвагинировать и отделяться от поверхности, образуя полую трубку.

Первичная полоска. Морфологическая структура гастролы амниот, которая закладывается путем локального утолщения эпибласта на заднем крае *area pellucida*, называемого серпом Коллара. Гомологична бластопору амфибий.

Первичная ресничка. Единственная неподвижная ресничка, обнаруженная на большинстве клеток; не имеет центральной пары микротрубочек и участвует в части сигнального пути Hedgehog, транспортируя сигнальные молекулы по своим микротрубочкам с помощью моторных белков.

Первичная эмбриональная индукция. Процесс, посредством которого закладывается дорсальная ось и центральная нервная система в результате взаимодействия с осевой мезодермой, происходящей у эмбрионов амфибий из дорсальной губы бластопора.

Первичная энтодерма. Слой энтодермальных клеток, возникающий в раннем развитии млекопитающих, когда внутренняя клеточная масса разделяется на два слоя. Нижний слой, соприкасающийся с полостью бластоцисты, является первичной энтодермой и гомологичен гипобласту эмбриона птицы. Он сформирует внутреннюю оболочку желточного мешка и будет использоваться для позиционирования места гастрюляции, регулирования движений клеток в эпибласте

и ускорения созревания клеток крови. Это внезародышевый слой, который не войдет в состав собственно эмбриона.

Первичная ямка. Во время гастрюляции птиц формируется воронкообразное углубление в центре гензеновского узелка, через которое мигрируют клетки, образующие хорду и прехордальную пластинку. См. также **Гензеновский узелок**.

Первичное капиллярное сплетение. Сеть капилляров, образованных эндотелиальными клетками во время васкулогенеза.

Первичное определение пола (определение гонадного пола). Детерминация гонад как яичников либо как семенников. Первичное определение пола у млекопитающих является хромосомным и обычно не зависит от окружающей среды, но у других позвоночных может находиться в зависимости от окружающей среды.

Первичноротые. Животные, которые формируют рот в области бластопора, например моллюски. Сравните с **Вторичноротые**.

Первичные личинки. Личинки, которые имеют план строения тела, совершенно отличный от взрослого. Пример: плутеусы морских ежей. Сравните с **Вторичные личинки**.

Первичные половые клетки. Клетки-предшественники гамет, которые обычно возникают внегонадно и мигрируют в развивающиеся гонады.

Первичные сперматоциты. Клетки, возникающие в результате митотического деления сперматогония типа В, которые сначала проходят период роста, а затем вступают в мейоз.

Первичный гипобласт (гипобластные островки). Клетки *area pellucida* птичьей бластодермы, которые индивидуально мигрируют в субгерминальную полость, образуя отдельные несвязанные кластеры, содержащие по 5–20 клеток. В дальнейшем не входят в состав эмбриона.

Первичный гипобласт. Клеточный слой, формирующийся во время гастрюляции эмбрионов птиц из клеток, которые сначала отделяются от переднего эпибласта, образуя разъединенные островки, а затем коллективно мигрируют под передний эпибласт.

Первичный ооцит. Развивающееся яйцо, которое прошло стадию размножения оогониев и находится на стадии роста, но еще не приступило к мейотическому делению. Содержит большое ядро, называемое зародышевым пузырьком. На этом этапе в яйце синтезируется и запасается мРНК (материнская мРНК). У млекопитающих первичный ооцит задерживается на стадии профазы I мейоза до момента непосредственно перед овуляцией, когда первое мейотическое деление завершается и ооцит становится вторичным. Второе мейотическое деление затем приостанавливается до момента оплодотворения.

Первичный узелок. См. **Гензеновский узелок**.

Первое полярное тельце. Меньшая клетка, образующаяся в результате первого мейотического деления первичного ооцита; в результате этого асимметричного деления образуется большая клетка, получающая большую часть цитоплазмы (вторичный ооцит), и кро-

шечная клетка, которая в итоге дегенерирует (первое полярное тело). Обе клетки гаплоидны.

Переднее поле сердца. Клетки поля сердца, образующие тракт оттока (конус и артериальный ствол, правый желудочек).

Передне-задняя ось (антерио-постериорная, AP). Ось тела, определяющая голову в противовес хвоста (или рот в противопоставлении с анусом). Применительно к конечности она соответствует оси от большого пальца (передняя часть) к мизинцу (задняя часть).

Передние кишечные ворота. Заднее отверстие развивающейся передней кишки, которое открывается в область будущей средней кишки, сообщающейся на этом этапе с желточным мешком.

Передний невропор. См. **Невропор**.

Передняя висцеральная энтодерма (AVE). Структура эмбриона млекопитающего, эквивалентная гипобласту птиц и схожая с головной частью организатора амфибий, которая секретирует антагонисты Nodal и создает переднюю область.

Передняя некротическая зона. Зона программируемой клеточной гибели на передней стороне развивающейся конечности, которая помогает сформировать конечность.

Перенос ядер соматических клеток (somatic sell nuclear transfer (SCNT)), иногда не вполне корректно называемый клонированием). Процедура, в которой ядро соматической клетки переносится в активированное энуклеированное яйцо и направляет развитие целостного организма с тем же геномом, что и донорская клетка.

Переходная зона. Зона развивающейся нервной трубки позвоночных между областью, которая подвергается первичной нейруляции, и областью, которая подвергается вторичной нейруляции. Размер этой зоны варьирует среди разных видов. См. также **Первичная нейруляция** и **Вторичная нейруляция**.

Перешеек. Узкий сегмент яйцевода млекопитающих, прилегающий к матке.

Перидерма. Временный подобный эпидермису эмбриональный покров, который отслаивается, когда внутренний слой дифференцируется и образует настоящий эпидермис.

Периимплантационный период. У плацентарных млекопитающих эмбриональный период, который начинается с момента вылупления бластоцисты и покрывает ее первые взаимодействия с эндометрием матки.

Перикардальная полость. Отделение целома, которое окружает сердце. Сравните с **Брюшная полость**; **Плевральная полость**.

Периклинальные деления. У растений клеточные деления, при которых новые клеточные стенки располагаются параллельно поверхности. Сравните с **Антиклинальные деления**.

Период покоя. У семенных растений длительный период покоя, в котором могут находиться семена до прорастания.

Периостальная кость. Кость, которая добавляет толщину длинным костям и происходит из мезодермы путем интрамембранозного окостенения.

Периферическая нервная система. Все нервы и нейроны, лежащие вне центральной нервной системы.

Перицикл. Слой клеток в корнях растений, расположенный между эндодермой и сосудистой тканью. Содержит взрослые ствольные клетки, которые могут образовывать новые апикальные меристемы корня для роста боковых корней.

Перициты. Подобные гладкомышечным клетки, которые рекрутируются для покрытия эндотелиальных клеток во время васкулогенеза.

Пермиссивное взаимодействие. См. **Разрешительное взаимодействие**.

Пестик. Женский репродуктивный орган цветка покрытосеменных, содержащий рыльце, завязь и часто столбик.

Петрозальные плакоды. Пара эпибранхиальных плакод у позвоночных; дают начало сенсорным компонентам парного IX (языкоглоточного) черепного нерва, который иннервирует язык, каротидный синус, каротидные тельца и другие структуры.

Печеночный дивертикул. Предшественник печени — зачаток энтодермы, который выходит из передней кишки в окружающую мезенхиму.

Пиальная поверхность. Внешняя поверхность мозга; название обусловлено близостью к *pia mater*, одной из оболочек мозга.

Пигментный эпителий. См. **Пигментный эпителий сетчатки**.

Пигментный эпителий сетчатки. Меланинсодержащий слой глаза позвоночных, лежащий позади нейросетчатки. Формируется из внешнего слоя глазного бокала. Черный пигмент меланин поглощает свет, проходящий через нейросетчатку, предотвращая его отражение, способное исказить воспринимаемое изображение.

Пионерные нервные волокна. Аксоны, которые идут впереди других аксонов и служат для них ориентирами.

Пионерные факторы транскрипции. Факторы транскрипции (например, FoxA1 и Pax7), которые могут проникать в репрессированный хроматин и связываться с энхансерными последовательностями ДНК в нем. Критически важны для спецификации отдельных клеточных типов.

Питающие клетки (трофоциты). Клетки, обеспечивающие питание развивающегося яйца. В каждой овариоле *Drosophila* пятнадцать взаимосвязанных питающих клеток синтезируют мРНК и белки, которые транспортируются в один развивающийся ооцит.

Пищеварительная труба. Кишка зародыша, которая тянется от глотки до клоаки. Выросты из пищеварительного тракта образуют щитовидную железу, тимус и околощитовидные железы, легкие, печень, желчный пузырь и поджелудочную железу.

Плазмодесмы. Цитоплазматические каналы между соседними растительными клетками, обеспечивающие прямой транспорт веществ между клетками.

Плакоды. Области утолщения эктодермы. К ним относятся черепные плакоды (например, обонятельные, хрусталиковые и слуховые плакоды) и эпидермальные плакоды кожных придатков, такие как волосы и перья, которые образуются в результате индукционных взаимодействий между дермальной мезенхимой и эктодермальным эпителием.

Плакоды боковой линии. Парные эктодермальные плакоды, формирующиеся как задние черепные плакоды у земноводных и рыб. Генерируют нейромасты, которые содержат механосенсорные волосковые клетки и иннервирующие их нейроны, чувствительные к движению воды, слабым биоэлектрическим полям и изменению давления. См. также **Волосковые клетки**.

Плакоды эктодермальных придатков. Утолщения эпидермальной эктодермы, участвующие в формировании несенсорных структур, таких как волосы, зубы, перья, молочные и потовые железы.

Пластиды. Органеллы, характерные для растительных клеток; выполняют множество функций, в том числе фотосинтез. Пример: хлоропласты.

Пластинка. Плоская протяженная структура организации нейронов в мозге наряду с кластерами (ядра).

Пластичность развития. Способность эмбриона или личинки реагировать на воздействие окружающей среды изменением формы, состояния, движения или уровнем активности (т. е. фенотипическими изменениями).

Плацента. Орган плацентарных млекопитающих, через который осуществляется связь кровообращения плода и матери; выполняет эндокринную, иммунную, питающую и дыхательную функции. Состоит из материнской части (эндометрий матки, который видоизменяется во время беременности — децидуа) и плодной части (хорион).

Плевральная полость. Отделение целома, которое окружает легкие. Сравните с **Перикардальная полость**; **Брюшная полость**.

Плейотропия. Явление наличия нескольких разных эффектов, опосредуемых одним геном или парой генов.

Плод. У цветковых растений — созревшая и содержащая зрелые семена завязь или завязи.

Плод. Этап развития млекопитающих между эмбриональной стадией и рождением, характеризующийся ростом и изменениями формы. У человека с девятой недели беременности до рождения.

Плодный (фетальный) период. В развитии человека — период, следующий за эмбриональным периодом, с конца 8 недель до рождения; период после того, как системы органов в основном сформировались и обычно происходит рост и изменения формы.

Плутеус. Планктонная личинка морских ежей и офиур, которая двусторонне симметрична, имеет ресничные шнуры и длинные руки, поддерживаемые скелетными спикулами.

Плюрипотентная гемопоэтическая стволовая клетка. См. **Гемопоэтическая стволовая клетка**.

Плюрипотентность. В пер. с лат. — способный на многие вещи. Способность плюрипотентных стволовых клеток давать начало различным типам клеток, являющихся производными трех зародышевых листков (мезодерма, энтодерма, эктодерма), из которых возникают все клетки организма. Клетки внутренней клеточной массы млекопитающих плюрипотентны, как и эмбриональные стволовые клетки. Каждая из них может генерировать клетки любого типа в организме, кроме клеток трофобласта, отличия от которых уже установлены. Зародышевые клетки и опухоли из зародышевых клеток (тератокарциномы) также могут образовывать плюрипотентные стволовые клетки. Сравните с **Тотипотентность**.

Плюрипотентные стволовые клетки взрослого организма. Стволовые клетки взрослого организма, способные дать начало всем типам клеток взрослого. Пример: небласти планарии.

Поверхностное дробление. Тип дробления централецитарных яиц, которое происходит только в тонком слое цитоплазмы по периферии клетки, что обусловлено наличием большого количества центрально расположенного желтка, как у насекомых.

Поверхностный слой. Популяция клеток эмбрионов *Danio* на стадии бластулы; состоит из наиболее поверхностных клеток бластодермы, которые образуют эпителиальный слой толщиной в одну клетку. Образует внезародышевый защитный покров, который сбрасывается во время дальнейшего развития.

Пограничная борозда. Продольная борозда, которая разделяет развивающийся спинной и продолговатый мозг на дорсальную (получает сенсорную информацию) и брюшную (инициирует двигательные функции) половинки.

Подшва. Раздутое мембранное расширение на базальном конце нейроэпителиальной или радиальной глиальной клетки. Подшвы клеток радиальной глии обвивают кровеносные сосуды головного мозга, чтобы установить гематоэнцефалический барьер.

Покой. Период неактивности или спячки; часто применительно к функционированию стволовых клеток.

Поле конечности. Область зародыша, содержащая все клетки, способные сформировать конечность.

Полиаденилирование. Добавление «хвоста» примерно из 200–300 аденильных остатков к РНК-транскрипту, примерно на 20 оснований ниже последовательности AAUAAA. ПолиА-хвост: (1) обеспечивает стабильность мРНК; (2) позволяет мРНК выходить из ядра; (3) позволяет мРНК транслироваться в белок.

ПолиА-хвост. Ряд остатков аденина (А), которые ферменты добавляют к 3'-концу мРНК в ядре. Придает стабильность мРНК, позволяет ей выходить из ядра и транслироваться в белок.

Полидактилия. Наличие дополнительных пальцев, например дополнительный коготь у пиренейских горных собак.

Полиспермия. Проникновение нескольких сперматозоидов во время оплодотворения, которое приводит к анеуплоидии (аномальному числу хромосом) и либо к смерти, либо к аномальному развитию. При физиологической полиспермии, которая встречается у *Drosophila* и птиц, в яйцеклетку попадает несколько сперматозоидов, но только один мужской пронуклеус сливается с женским пронуклеусом.

Политенные хромосомы. Толстые хромосомы в личиночных клетках *Drosophila* (кроме имагинальных клеток, дающих начало взрослым структурам), ДНК которых проходит много циклов репликации без разделения. В местах активной транскрипции генов образуют «пuffs», которые легко различимы в световой микроскоп.

Полифенизм. Тип фенотипической пластичности, относящийся к прерывистым («или/или») фенотипам, определяемым окружающей средой. Сравните с **Норма реакции**.

Половая плазма. Цитоплазматические детерминанты (мРНК и белки) в яйцах некоторых видов, включая лягушек, нематод и мух, которые автономным способом специфицируют первичные половые клетки.

Половой бугорок. Структура, расположенная краниально по отношению к клоакальной мембране на индифферентной стадии дифференцировки наружных половых органов млекопитающих. Формирует клитор в женском зародыше или половой член в мужском.

Половой валик. Утолщение висцеральной мезодермы и подлежащей мезенхимной промежуточной мезодермы на медиальном крае мезонефроса; образует семенник или яичник. См. также **Герминальный эпителий**.

Половые клетки. Группа клеток, выделенных для репродуктивной функции; половые клетки становятся клетками половых желез (яичника и семенника), которые подвергаются мейотическим клеточным делениям для образования гамет. Сравните с **Соматические клетки**.

Половые шнуры. Петли в медуллярной (центральной) области развивающегося семенника, образованные развивающимися клетками Сертоли и вселяющимися половыми клетками. Станут семенными канальцами, в которых будет происходить сперматогенез.

Поляризация. Первая стадия клеточной миграции, на которой клетка определяет передний и задний концы, направляемые диффундирующими сигналами (например, хемотактический белок) или сигналами внеклеточного матрикса. Эти сигналы реорганизуют цитоскелет так, что в передней части клетки будет происходить полимеризация актина и образование ламеллоподий (или филоподий).

Поля сердца (кардиогенная мезодерма). Две симметричные области висцеральной мезодермы у позвоночных, из которых развивается сердце. У амниот клетки полей сердца во время гаструляции мигрируют через первичную полосу, так что исходное медиально-латеральное расположение этих клеток станет передне-задней (рострокаудальной) осью развивающейся сердечной трубки.

Полярная лопасть. Безъядерный участок цитоплазмы, обособляемый непосредственно перед первым делением дробления (а иногда и перед вторым) у некоторых спирально дробящихся зародышей (главным образом у моллюсков и кольчатых червей). Содержит детерминанты для правильного ритма дробления и ориентации делений D-бластомера.

Полярная плазма. Цитоплазма на заднем полюсе ооцита *Drosophila*, которая содержит детерминанты для образования брюшка и половых клеток.

Полярное тельце. См. **Редукционное тельце**.

Полярные гранулы. Частицы, содержащие факторы, важные для спецификации зародышевой линии, которые локализованы в полярной плазме и полярных клетках *Drosophila*.

Полярные клетки. Около пяти ядер зародышей *Drosophila*, которые достигают поверхности заднего полюса в течение девятого цикла деления и окружены клеточными мембранами. Полярные клетки дают начало гаметам взрослого насекомого.

Помехоустойчивость (канализация). Способность организма развивать один и тот же фенотип, несмотря на возмущения в окружающей среде или мутации. Это функция взаимодействий внутри и между модулями развития.

Популяционная асимметрия. Способ поддержания гомеостаза в популяции стволовых клеток, при котором одни клетки более склонны к образованию дифференцированного потомства, в то время как другие делятся для поддержания пула стволовых клеток.

Пороговая модель. Модель развития, при которой биологические события запускаются при достижении определенной концентрации морфогена или гормона.

Порок развития. Нарушение, вызванное генетическим событием, например генной мутацией, хромосомной анеуплоидией или транслокацией.

Последний общий предок эукариот (LECA). Предполагаемый предок всех растений, животных и грибов, возможно, был одноклеточным простейшим и имел жгутики и митохондрии.

Последний универсальный общий предок (LUCA). Древний общий предок всей жизни на Земле.

Последовательность терминации транскрипции (терминатор). Последовательность ДНК гена, где транскрипция прекращается. Транскрипция продолжается примерно на 1000 нуклеотидов за пределы сайта AATAAA 3'-нетранслируемой области гена.

Постсинаптическая клетка. Клетка-мишень, в которой в ответ на химические нейротрансмиттеры, поступающие от пресинаптического нейрона, возникает деполяризация или гиперполяризация мембраны.

Посттрансляционная регуляция. Модификации, которые определяют, будет ли транслированный белок активным. Эти модификации могут включать расщепление ингибирующей пептидной последовательности; удержание в специфичных областях клетки; сборку с другими белками для формирования функциональной

единицы; связывание иона (например Ca^{2+}) или ковалентное добавление фосфатной или ацетатной группы.

Потенциал покоя. Мембранный электрический потенциал, определяемый концентрацией ионов на разных сторонах мембраны. Обычно равен -70 мВ, причем внутренняя часть клетки заряжена отрицательно по отношению к внешней стороне.

Потенция. В отношении стволовых клеток способность производить различные типы дифференцированных клеток.

Почка конечности. Круглая выпуклость, которая формирует будущую конечность; образуется в результате пролиферации мезенхимных клеток париетальной мезодермы боковой пластинки (клетки-предшественники скелета конечности) и из сомитов (клетки-предшественники мышц конечности).

Почка плавника. Зачаток ткани у эмбрионов рыб, которая приводит к появлению плавника; гомологичен почке конечности четвероногих позвоночных.

Почки мочеточников. Парные эпителиальные ветви у амниот, индуцированные метанефрогенной мезенхимой, которые ответвляются от каждого из парных нефрических протоков. Почки мочеточников образуют собирательные протоки, почечные лоханки и мочеточники, доставляющие мочу в мочевого пузыря.

Правозакрученность (дексиотропность). Свойство раковин улиток, при котором устье располагается справа от раковины. Смотрите также **Левозакрученность**.

Право-левая ось. Спецификация двух сторон тела животного.

Праймированное плюрипотентное состояние. Состояние эмбриональной стволовой клетки, у которой происходит развитие по направлению к эпибласту.

Праймированные эмбриональные стволовые клетки. Эмбриональные стволовые клетки, полученные из клеток внутренней клеточной массы, которые уже были в некоторой степени коммитированы к линии эпибласта. Сравните с **Наивные эмбриональные стволовые клетки**, см. также **Эмбриональные стволовые клетки**.

Праймированный. Подготовленный; если говорить об эмбриональных стволовых клетках, готовый к дифференцировке.

Прародитель (прогенитор). Предок в прямой линии; предок или предшественник.

Прегранулезные клетки. Клетки примордиального фолликула в яичнике, которые развиваются наиболее близко к половым клеткам. Становятся клетками гранулезы фолликула.

Предшественники. См. **Клетки-предшественники**.

Предшественники нейромезодермы. См. **Нейромезодермальные предшественники**.

Преимплантационная генетика. Тестирование на генетические заболевания с использованием бластомеров из эмбрионов, полученных путем экстракорпорального оплодотворения, перед имплантацией эмбриона в матку.

Преметаморфоз. Первая стадия метаморфоза амфибий, на которой щитовидная железа начала созревать и вы-

деляет низкие уровни тироксина и очень низкие уровни трийодтиронина. Рецептор TR α уже экспрессируется, а TR β еще нет.

Пре-мРНК. См. **Ядерная РНК**.

Пренатальная диагностика. Использование пробы ворсин хориона или амниоцентеза для диагностики генетических заболеваний до рождения ребенка.

Пресинаптический нейрон. Нейрон, который передает химические нейротрансмиттеры клетке-мишени, вызывая деполяризацию или гиперполяризацию ее мембраны.

Пресомитная мезодерма (сегментарная пластинка). Мезодерма, которая формирует сомиты.

Преформизм. Точка зрения, поддерживаемая ранним микроскопистом Марчелло Мальпиги, о том, что органы зародыша заранее присутствуют в миниатюрной форме внутри яйцеклетки (или сперматозоида). Его следствие, концепция инкапсуляции, постулировало, что каждое следующее поколение уже существует в заранее заданном состоянии в половых клетках предыдущего поколения, таким образом гарантируя постоянство вида.

Прехордальная пластинка. Предшественник мезодермы головы. Клетки мезодермы, которые перемещаются внутрь во время гаструляции, двигаясь впереди от хордомезодермы.

Преэклампсия. Состояние здоровья беременных женщин, которое характеризуется гипертонией, низкой почечной фильтрацией и дистрессом плода. Основная причина преждевременных родов и смерти плода и матери.

Придаток семенника. Полученная из вольфового протока трубка, прилегающая к семеннику, соединяет эфферентные каналы с семявыносящим протоком.

Примаксиальные мышцы. Межреберная мускулатура и глубокие мышцы спины, которые формируются из участков миотома, ближайших к нервной трубке.

Притягивающее centrosомы тело. Клеточная структура, которая в некоторых бластомерах беспозвоночных позиционирует centrosомы асимметрично и рекрутирует определенные мРНК, так что полученные дочерние клетки имеют разные размеры и разные свойства.

Проакрозин. Неактивная форма протеиназы сперматозоидов млекопитающих, которая хранится в акросоме, высвобождается во время акросомной реакции и помогает сперматозоидам проходить через *zona pellucida* яйцеклетки.

Прогамный этап. Развитие пыльцы от опыления до оплодотворения; период роста пыльцевой трубки через женский пестик.

Прогенез. Состояние, при котором гонады и половые клетки развиваются с большей скоростью, чем остальная часть тела, становясь сексуально зрелыми, в то время как остальная часть тела все еще находится в ювенильной фазе. Сравните с **Неотения**.

Прогенитор. См. **Прародитель**.

Прогениторные клетки. Относительно недифференцированные клетки, способные делиться несколько раз, прежде чем дифференцироваться, и, в отличие от ство-

ловых клеток, не способные к неограниченному самообновлению. Их иногда называют **транзитными усиливающими клетками**, потому что они делятся во время миграции.

Прогерия. Синдромы преждевременного старения; у людей и мышей, по-видимому, обусловлены мутациями, которые препятствуют функционированию ферментов репарации ДНК.

Прогестерон. Стероидный гормон, важный для поддержания беременности у млекопитающих. Прогестерон, секретируемый клетками кумулюса, может действовать как хемотаксический фактор для сперматозоидов.

Программируемая гибель клеток. См. Апоптоз.

Продолговатый мозг. См. Миелэнцефалон.

Прозэнцефалон. Передний мозг; самый передний пузырек развивающегося мозга позвоночных. Формирует два вторичных мозговых пузыря: телэнцефалон и диэнцефалон.

Прокамбий. Слой стволовых клеток у растений, который продуцирует сосудистую ткань; может также давать начало перicycle в корнях.

Проксимально-дистальная ось. Ось от ближнего к дальнему, например от плеча (или бедра) к пальцам.

Промежуточная зона. См. Мантийная зона.

Промежуточная мезодерма. Мезодерма, расположенная латерально и прилегающая к параксиальной мезодерме. Образует кору надпочечников и мочеполовую систему, состоящую из почек, половых желез и связанных с ними протоков.

Промежуточные клетки-предшественники. Предшественники нервных клеток субвентрикулярной зоны; происходят от клеток радиальной глии.

Промежуточные сперматогонии. Первые коммитированные сперматогенные стволовые клетки млекопитающих.

Промежуточный мозг. См. Диэнцефалон.

Прометаморфоз. Вторая стадия метаморфоза амфибий, во время которой щитовидная железа созревает и выделяет больше гормонов.

Промотор. Область гена, содержащая последовательность ДНК, с которой связывается РНК-полимераза II, в результате чего инициируется транскрипция. См. также **СрG-островки**; **Энхансер**.

Промоторы с высоким содержанием СрG. Промоторы, последовательность которых содержит большое количество СрG-островков; часто регулируют гены развития, необходимые для построения организма; состояние этих промоторов по умолчанию «включено». См. также **СрG-островки**.

Промоторы с низким содержанием СрG. Промоторы генов, продукты которых обычно характеризуют зрелые, полностью дифференцированные клетки. Сайты СрG обычно метилированы, и их состояние по умолчанию «отключено», хотя они могут быть активированы определенными факторами транскрипции. См. также **СрG-островки**.

Пронефрический проток. Структура, которая возникает в промежуточной мезодерме, мигрирует каудально и побуждает окружающую мезенхиму образовать пронефрос или канальцы первичной почки эмбриона. Пронефрические канальцы образуют функционирующие почки у рыб и личинок амфибий, но, как полагают, неактивны у амниот. По мере того как проток продолжает расти каудально, он индуцирует мезонефрическую мезенхиму образовать канальцы, после чего его называют мезонефрическим протоком.

Пронефрос. Первая область почечной мезенхимы, образующая почечные канальцы у позвоночных. Пронефрос — это функционирующая почка у личинок рыб и амфибий, но, как полагают, он неактивен у амниот и дегенерирует после развития других областей почки.

Пронимфа. Стадия развития аметаболических насекомых сразу после вылупления, когда организм несет структуры, которые позволили ему выбраться из яйца; после этой стадии насекомое выглядит как недоразвитое взрослое.

Пронуклеусы. Мужские и женские гаплоидные ядра в оплодотворенной яйцеклетке, которые сливаются, образуя диплоидное ядро зиготы.

Протамины. Основные белки, сильно уплотненные дисульфидными связями; упаковывают ДНК ядра сперматозоида.

Протеогликаны. Большие молекулы внеклеточного матрикса, состоящие из основных белков (таких как синдекан) с ковалентно присоединенными гликозаминогликановыми полисахаридными боковыми цепями. Двумя наиболее распространенными гликозаминогликанами протеогликанов являются гепарансульфат и хондроитинсульфат.

Протеом. Количество и разнообразие белков, кодируемых геномом.

Протокадгерины. Класс кадгеринов, которые связываются с актиновым цитоскелетом через катенины. Игрют роль в удержании вместе клеток мигрирующего эпителия и важны в отделении хорды от окружающей мезодермы во время ее формирования.

Проторакальная железа. У насекомых — железа, которая выделяет экдизон, гормон линьки; производство экдизона стимулируется проторацитотропным гормоном.

Проторацитотропный гормон. Пептидный гормон, который высвобождается нейросекреторными клетками мозга в ответ на нервные, гормональные сигналы или сигналы окружающей среды, и запускает процесс линьки у насекомых. Стимулирует выработку экдизона в проторакальной железе.

Проэмбрион. Стадия развития семенного растения, наступающая после первого асимметричного дробления зиготы. На этой двухклеточной стадии меньшая апикальная клетка даст начало всем частям самого растения, кроме кончика корня; большая базальная клетка будет генерировать верхушку корня и суспензор, который соединяет эмбрион с питательными веществами в семени.

Проэритробласт. Предшественник эритроцитов.

Прямая генетика. Генетический подход, заключающийся в воздействии на организм мутагенных агентов и последующий скрининг определенных фенотипов. Сравните с **Обратная генетика**.

Прямое развитие. Эмбриогенез, который характеризуется отсутствием личиночной стадии, когда эмбрион переходит к построению маленькой взрослой особи.

Псевдогермафродитизм. Состояние интерсекса, при котором вторичные половые признаки отличаются от того, что можно было бы ожидать от гонадного пола. Мужским псевдогермафродитизмом называют состояния, при которых гонадный пол является мужским, а вторичные половые признаки — женскими (например, синдром нечувствительности к андрогенам). Женским псевдогермафродитизмом называют обратную ситуацию (например, врожденная гиперплазия надпочечников).

Пузырный занос. Опухоль человека, напоминающая плацентарную ткань; возникает, когда гаплоидный сперматозоид оплодотворяет яйцеклетку, в которой отсутствует женский пронуклеус и весь геном происходит из сперматозоида, что препятствует нормальному развитию; является иллюстрацией роли геномного импринтинга в развитии.

Пуповина. Соединительный шнур, происходящий из аллантоиса, который обеспечивает циркуляцию эмбриональной крови к маточным сосудам матери у плацентарных млекопитающих.

Пупочные вены. См. **Омфаломезентериальные вены** и **Желточные вены**.

Пучкование. В развитии нервной системы процесс присоединения одного аксона к другому и использования его для роста.

Пыльник. Продуцирующий пыльцу орган на тычинке (мужская часть) цветка.

Р

Радиальная глия. Нейральные клетки-предшественники, обнаруженные в желудочковой зоне развивающегося мозга. При каждом делении они генерируют другую клетку желудочковой зоны и более коммитированный тип клеток, которые уходят и дифференцируются.

Радиальная интеркаляция. Перемещение глубоких клеток эпибласта эмбрионов рыб в более поверхностный слой, помогающее усилить эпиболию во время гаструляции.

Радиальное голобластическое дробление. Тип дробления (например, у иглокожих), при котором плоскости дробления делят яйцеклетку полностью на отдельные клетки и параллельны или перпендикулярны анимально-вегетативной оси яйца.

Радужка. Пигментированное кольцо мышечной ткани глаза, которое контролирует размер зрачка и определяет цвет глаз.

Развитие. Процесс прогрессивного непрерывного изменения, которое порождает сложный многоклеточный организм из одной клетки; происходит в течение всего эмбриогенеза, созревания до взрослой формы и продолжается до старения.

Разметка (паттернирование). Совокупность процессов, с помощью которых эмбриональные клетки образуют упорядоченные пространственные композиции дифференцированных тканей.

Разрешительное взаимодействие (пермиссивное взаимодействие). Индукционное взаимодействие, при котором отвечающая ткань уже была специфицирована и нуждается только в среде, позволяющей экспрессировать эти признаки.

Разрушение зародышевого пузырька (GVBD). Распад ядерной мембраны первичного ооцита (зародышевого пузырька) при возобновлении мейоза во время оогенеза.

Раневой эпидермис. Эпидермальные клетки, которые при регенерации конечности саламандры мигрируют по культе и покрывают поверхность раны сразу после ампутации; позже утолщается и формирует апикальную эктодермальную шапочку.

Рассеивающий фактор. См. **Фактор роста гепатоцитов**.

Расширенный эволюционный синтез. Модель эволюции, подчеркивающая пластичность развития, эпигенетическое наследование, сужение ниши и взаимодействия между организмом и окружающей средой.

Реакционно-диффузионный механизм (модель Тьюринга). Модель формирования паттерна развития, особенно конечности, в которой два однородно распределенных вещества (активатор А, вещество, которое активирует себя, а также собственный, быстрее диффундирующий ингибитор, вещество I) взаимодействуют с образованием стабильного сложного паттерна во время морфогенеза. Согласно этой модели, изложенной в начале 1950 г. математиком Аланом Тьюрингом, различные паттерны, генерируемые этим механизмом, представляют региональные различия в концентрациях двух веществ.

Регенеративная медицина. Терапевтическое использование стволовых клеток для коррекции генетических патологий (например, серповидноклеточной анемии) или восстановления поврежденных органов. (Регенеративная медицина предполагает терапевтическое использование не только стволовых клеток, но и клеток факторов роста, иных активных веществ для целей восстановления структур или функций организма. — *Прим. ред. перевода*.)

Регенерационная бластема. Совокупность относительно недифференцированных клеток, которые формируют новые структуры под действием паракринных факторов, расположенных на поверхности разреза. Сбор клеток может происходить из дифференцированной ткани вблизи места ампутации, которая дедифференцируется, проходит период митозов, а затем редифференцируется в потерянные структуры, как в регенерирующей конечности саламандры, или может происходить из плюрипотентных стволовых клеток, которые мигрируют на поверхность среза, как при регенерации плоского червя.

Регенерация. Способность восстанавливать структуру тела или орган, который был поврежден или разрушен при травме или болезни.

Регенерация *de novo*. Регенерация структуры заново из клеток, которые перепрограммированы для ее формирования, а не из дифференцированных клеток этой структуры. Например, у некоторых растений возможна регенерация *de novo* целых органов из отдельных клеток.

Регенерация, опосредованная стволовыми клетками. Процесс, с помощью которого стволовые клетки позволяют организму восстанавливать утраченные органы или ткани (например, волосы, клетки крови).

Регуляция. Способность респецифицировать клетки таким образом, что удаление клеток, которые должны стать определенной структурой, может быть компенсировано другими клетками. Происходит, например, когда целый эмбрион формируется клетками, которые внесли бы вклад только в определенные части первоначального эмбриона. Проявляется также в способности двух или более ранних эмбрионов образовывать один химерный организм, а не близнецов, тройню или многоголового индивидуума.

Редукционное тельце (полярное тельце). Маленькая клетка, почти не содержащая цитоплазму, которая появляется при асимметричном мейотическом делении ооцита. Первое полярное тельце возникает в результате первого мейотического деления и гаплоидно, а второе полярное тельце является результатом второго мейотического деления и тоже гаплоидно.

Резакт. Пептид из 14 аминокислот, выделенный из студенистой оболочки яиц морского ежа *Arbacia punctulata*; действует как хемотаксический фактор и активирует сперматозоиды того же вида, т. е. является механизмом обеспечения видоспецифичности оплодотворения. См. также **Активирующий сперматозоиды пептид**.

Реляционная плейотропия. Действие гена в одной части эмбриона, которое влияет на другие части не путем экспрессии в них, а путем инициирования каскада событий, которые влияют на них.

Реотаксис. Форма движения, когда клетка или животное ориентируются против потока газа или жидкости. Считается, что сперматозоиды, проходящие через женский репродуктивный тракт, имеют положительный реотаксис.

Репортерный ген. Ген, продукт которого легко идентифицировать и который обычно не содержится в исследуемых клетках. Может быть слит с регуляторными элементами исследуемого гена, вставлен в эмбрионы и затем проверен на наличие его экспрессии. Если последовательность содержит энхансер, репортерный ген должен стать активным в определенные моменты времени и в определенных местах. Примеры: гены зеленого флуоресцентного белка (GFP) и β -галактозидазы (*lacZ*).

Репрессор. ДНК- или РНК-связывающий регуляторный элемент, активно подавляющий транскрипцию определенного гена.

Ресегментация. Процесс, происходящий во время формирования позвонков из склеротомов; ростральный сегмент каждого склеротома объединяется с хвостовым сегментом следующего более anteriорного склеротома и формирует зачаток позвонка; позволяет мышцам

позвоночного столба, формирующимся из миотомов, координировать движение скелета при боковых движениях тела.

Реснички. Короткие, часто многочисленные, подвижные отростки клетки, содержащие центральную аксоному, составленную микротрубочками по схеме 9+2 (9 внешних дублетов и 2 центральных синглета). Их биение создает движущую силу, используемую для локомоции или перемещения жидкой среды, окружающей неподвижные ресничные клетки. Сравните с **Жгутик**.

Ретикулоцит. Клетка, полученная из эритробласта млекопитающего, вытеснившего ядро. Больше не может транскрибировать ген глобина, но все еще транслирует существующие мРНК в глобины; дифференцируется в зрелый эритроцит, в котором уже не происходит даже трансляция мРНК.

Ретиноевая кислота. Производное витамина А и морфоген, участвующий в формировании передне-задней оси. Клетки, получающие высокие уровни ретиноевой кислоты, экспрессируют задние гены.

Ретиноевая кислота-4-гидроксилаза. Фермент, который разлагает ретиноевую кислоту.

Ретинотектальная проекция. Карта связей сетчатки со зрительным центром. Точечное соответствие между клетками сетчатки и клетками тектума, которое позволяет животному видеть непрерывное изображение.

Рецептор. Белок, который функционирует, связывая лиганд. См. также **Лиганд**.

Рецептор экдизона (EcR). Ядерный белок, который связывается с экдизоном у насекомых; будучи связанным, образует активный комплекс с другим белком, который связывается с ДНК, вызывая транскрипцию генов, чувствительных к экдизону. Эволюционно связаны и почти идентичны по структуре с рецепторами гормонов щитовидной железы.

Рецепторная тирозинкиназа. Трансмембранный рецептор, связывание лиганда (паракринного фактора) с внеклеточным доменом которого вызывает конформационные изменения в цитоплазматических доменах, что активирует киназную активность, которая использует АТФ для фосфорилирования специфических остатков тирозина определенных белков.

Рецепторные тирозинкиназы. Эффекторы сигнального пути (RTK-путь). Связывание с лигандом приводит к димеризации рецепторных тирозинкиназ и аутофосфорилированию рецептора. Адаптерный белок распознает фосфорилированные тирозины и активирует промежуточный белок GEF, который активирует белок Ras G, позволяя фосфорилировать GDF-связанные Ras. В то же время белок GAP стимулирует гидролиз этой фосфатной связи, возвращая Ras в неактивное состояние. Активный Ras активирует протеинкиназу C (PKC) Raf, которая, в свою очередь, фосфорилирует ряд киназ. В конце концов активированная киназа изменяет экспрессию генов в ядре отвечающей клетки, фосфорилируя определенные факторы транскрипции (которые становятся способны проникать в ядро и влиять на транскрипцию генов) и определенные факторы трансляции (которые изме-

няют уровень синтеза белка). Во многих случаях этот путь усиливается высвобождением Ca^{2+} .

Рецепторы тиреоидных гормонов. Ядерные рецепторы, которые связывают тиреоидные гормоны трийодтиронин (T_3), а также тироксин (T_4). Связанный с гормоном, тиреоидный рецептор становится транскрипционным активатором экспрессии генов. Существует несколько различных типов тиреоидных рецепторов, включая $\text{TR}\alpha$ и $\text{TR}\beta$.

Рецепторы фактора роста фибробластов (FGFR). Набор рецепторных тирозинкиназ, которые активируются факторами роста фибробластов, приводя к активации неактивной киназы и фосфорилированию некоторых белков (включая другие рецепторы FGF) в отвечающей клетке.

Реципрокные индукции. Тип индукционного процесса, при котором одна ткань индуцирует другую ткань, которая затем воздействует на исходную индуцирующую ткань и индуцирует ее; таким образом индуктор становится индуцированным.

Рилин. Белок внеклеточного матрикса, обнаружен в развивающемся мозжечке и головном мозге. В мозжечке он позволяет нейронам связываться с глияльными клетками в ходе миграции и формирования слоев; в головном мозге он направляет миграцию нейронов к пиальной поверхности.

Р-кадгерин. Плацентарный тип кадгерина, который встречается преимущественно в плаценте, где он помогает ей прилипнуть к матке. Смотрите также **Кадгерины**.

РНК-индуцированный сайленсинговый комплекс (RISC). Комплекс, содержащий несколько белков и микроРНК, которые могут связываться с 3'-UTR мРНК и ингибировать их трансляцию.

РНК-интерференция (РНКи). Процесс, посредством которого микроРНК ингибируют экспрессию специфичных генов, приводя к деградации их мРНК.

РНК-полимераза II. Фермент, который связывается с промотором ДНК и при активации катализирует транскрипцию РНК на матрице ДНК.

РНК-Seq (РНК-секвенирование). Использование технологии секвенирования следующего поколения для секвенирования и количественного определения РНК, присутствующей в биологическом образце.

Роговой слой. Наружный слой эпидермиса, состоящий из кератиноцитов, которые стали мертвыми сплюснутыми мешочками, заполненными белком кератином, со смещенными к одному краю клетки ядрами. Эти клетки на протяжении всей жизни постоянно слущиваются и заменяются новыми.

Розетки. Структуры, похожие на вертушку, например небольшие скопления нервных стволовых клеток, окруженные ресничными эпендимными клетками, обнаруженные в вентрикулярно-субвентрикулярной зоне мозга млекопитающих.

Ромбомеры. Периодические вздутия, которые делят ромбэнцефалон на более мелкие отсеки, каждый с разным статусом и разными нервными ганглиями.

Ромбэнцефалон. Первичный задний мозг, самый каудальный пузырь в развивающемся мозге позвоночных; образует два вторичных мозговых пузыря, метэнцефалон и миелэнцефалон.

Рострально-каудальный. В пер. с лат. — клюв-хвост. Передне-задняя позиционная ось; часто используется при описании эмбрионов или мозга позвоночных.

Ротационное дробление. Тип дробления, характерный для эмбрионов млекопитающих и нематод. У млекопитающих первое деление является нормальным меридиональным, а при втором делении один из двух бластомеров делится меридионально, а другой — экваториально. У *C. elegans* каждое деление дробления асимметрично и производит одну клетку-основательницу, которая производит дифференцированных потомков, и одну стволовую клетку. Линия стволовых клеток всегда делится меридионально и производит (1) переднюю клетку-основательницу и (2) заднюю стволовую клетку.

Рыльце. Поверхность на пестике, обычно на верхушке столбика, которая улавливает пыльцу.

С

Сайленсер. Регуляторный элемент ДНК, связывающий факторы транскрипции, которые активно подавляют транскрипцию определенного гена.

Сайт инициации транскрипции (кэп-последовательность). Последовательность ДНК гена, которая кодирует добавление модифицированного нуклеотидного «кэпа» на 5'-конце РНК вскоре после ее транскрибирования.

Сайт инициации трансляции. Кодон ATG (AUG в мРНК), который сигнализирует о начале первого экзона (и о кодирующей белок области) гена.

Сальные железы. Железы, которые связаны с волосными фолликулами и выделяют кожное сало — жирное вещество, которое служит для смазывания волос и кожи.

Самообновление. Способность клетки делиться и создавать таким образом точную копию себя.

Сателлитные клетки. Популяция мышечных стволовых клеток и клеток-предшественников, которые находятся рядом со взрослыми мышечными волокнами и могут реагировать на повреждения или физические упражнения, пролиферируя в миогенные клетки, сливающиеся и образующие новые мышечные волокна.

Свойства, зависящие от уровня, и эмерджентность. Принцип общей теории систем: свойства системы на любом данном уровне организации не могут быть полностью объяснены свойствами уровней «ниже» ее.

Связность (непротиворечивость). Научные доказательства, которые вписываются в систему других результатов и поэтому более легко принимаются.

Сегментарная пластинка. См. **Пресомитная мезодерма**.

Селективная аффинность. Принцип, который объясняет, почему дезагрегированные клетки повторно агрегируют в соответствии со своим эмбриональным положением. Например, внутренняя поверхность эктодермы имеет положительную аффинность к мезодермальным

клеткам и отрицательную к энтодерме, в то время как мезодерма имеет положительную аффинность как к эктодермальным, так и к энтодермальным клеткам.

Селекция ядерной РНК. Инструменты контроля экспрессии генов путем избирательного процессинга специфичных подмножеств ядерных РНК в различных типах клеток.

Семафорины. Белки внеклеточного матрикса, которые отталкивают мигрирующие клетки нервного гребня и конусы роста аксонов.

Семейство BMP. См. **Костные морфогенетические белки.**

Семенная оболочка. Внешняя защитная оболочка семяна. Образуется из двух слоев интегумента семязачатка.

Семенные каналцы. Трубочатые структуры, образующиеся в семенниках из половых тяжей. Содержат клетки Сертоли (питающие клетки) и сперматогонии (стволовые сперматогенные клетки).

Семя. Эмбриональное растение, созревший семязачаток, заключенный в защитную оболочку.

Семявыносящий проток. Трубка, происходящая из вольфова протока, через которую сперматозоиды проходят от придатка семенника к уретре.

Семядоли. Эмбриональные листья в семени растения, в которых запасаются питательные вещества, необходимые для эмбриогенеза и прорастания семени. Появляются у проростка, до того как образуются настоящие листья.

Семязачаток. У покрытосеменных растений — структура, включающая мегаспорангий и интегумент и после оплодотворения превращающаяся в семя.

Сенсорные плакоды. У позвоночных — эктодермальные плакоды, которые вносят вклад в органы чувств, образуя обонятельный эпителий, внутреннее ухо, хрусталик глаза и сенсорные ганглии черепа, а также органы боковой линии у земноводных и рыб.

Септа. Перегородка, которая делит камеру, например предсердные перегородки разделяют развивающееся предсердие на левое и правое.

Сердечная трубка. Линейная (вытянутая в передне-заднем направлении) структура, сформированная по средней линии полей сердца; станет предсердиями, желудочками и основанием аорты и легочных артерий.

Серое вещество. Области головного и спинного мозга, богатые телами нервных клеток. Сравните с **Белое вещество.**

Серп Коллара. См. **Первичная полоска.**

Серый серп. Полоса внутренней серой цитоплазмы, которая появляется после поворота кортикальной цитоплазмы относительно внутренней цитоплазмы в краевой области одноклеточного эмбриона амфибии. В этом месте начинается гастрюляция.

Сесамовидные кости. Мелкие кости в суставах, которые образуются в результате механического напряжения (например, надколенник). Возникают из мезодермы путем интрамембранного окостенения.

Сестринские хроматиды. Каждая из пары недавно реплицированных хроматид. Имеют одинаковую последовательность ДНК и соединены центромерой.

Сетчатка. См. **Нейросетчатка.**

Сеть семенника. Сеть тонких канальцев, которые переносят сперматозоиды из семенных канальцев в эфферентные протоки.

Сиамские близнецы. Монозиготные близнецы, которые имеют общую часть тела, в том числе могут иметь общий жизненно важный орган, такой как сердце или печень.

Сигнальные каскады. См. **Каскады сигнальной трансдукции.**

Симбиогенез. Гипотеза о происхождении эукариотических клеток в результате слияния прокариотических организмов, один из которых образовал ядро, а другой — митохондрию.

Симбиоз. В пер. с греч. — жить вместе. Относится к любой тесной связи между организмами разных видов.

Симбионт. Меньший организм в симбиотических отношениях, в котором другой организм намного больше и служит хозяином, в то время как меньший организм может жить на поверхности или внутри тела большего.

Симпоэз. Явление развития через взаимодействие множества видов, когда симбионты обеспечивают сигналы развития, необходимые хозяину, и хозяин часто отвечает взаимностью, облегчая размножение симбионта.

Синапс. Специализированный тип межклеточного контакта, при котором нейрон связывается с клеткой-мишенью (которая может быть другим нейроном или клеткой другого типа) и информация в форме молекул нейротрансмиттера (например, ацетилхолина, ГАМК, серотонина) передается через синаптическую щель между двумя клетками.

Синапсис. Высокоспецифичное параллельное выравнивание (спаривание) гомологичных хромосом во время первого мейотического деления.

Синаптическая щель. Узкое пространство, которое отделяет аксон сигнального нейрона от дендрита или сомы его клетки-мишени.

Синаптонемный комплекс. Белковая лента, которая образуется во время синапсиса между гомологичными хромосомами и удерживает их вместе. Имеет лестничную структуру с центральным элементом и двумя боковыми полосами, которые связаны с гомологичными хромосомами. См. также **Синапсис.**

Синдетом. В пер. с греч. — связанный. Структура, возникающая из наиболее дорсальных клеток склеротома, которые экспрессируют ген *scleraxis* и дают начало сухожилиям.

Синдром. В пер. с греч. — происходит вместе. Несколько пороков развития или патологий, возникающих одновременно. Генетически обусловленные синдромы вызваны: либо (1) хромосомным событием (например, трисомией 21 хромосомы, вызывающей синдром Дауна), когда несколько генов удаляются или добавляются,

либо (2) нарушением в одном гене, имеющем много эффектов.

Синдром Дауна. Синдром, вызванный наличием дополнительной копии 21 хромосомы у людей; включает такие аномалии, как изменение лицевых мышц, аномалии сердца и кишечника и когнитивные проблемы.

Синдром нечувствительности к андрогенам. Состояние интереса, при котором индивидиум ХУ имеет мутацию в гене, кодирующем белок рецептора андрогена, чувствительный к тестостерону. Это приводит к женскому внешнему фенотипу, отсутствию матки и яйцеводов и наличию брюшных яиц.

Синусоидальные эндотелиальные клетки. Клетки, которые выстилают крупные кровеносные каналы (синусоиды) печени и имеют решающее значение для функционирования печени. Выделяют также паракринные факторы, необходимые для деления стволовых клеток печени во время ее регенерации. Раньше считались мезодермальными по происхождению, но теперь известно, что они, по крайней мере частично, происходят из специализированных энтодермальных клеток.

Синцитиальная бластодерма. Стадия развития эмбриона *Drosophila* во время поверхностного дробления, когда ядра поделились, но еще не сформировались клеточные мембраны для разделения ядер на отдельные клетки.

Синцитиальная спецификация. Взаимодействия ядер и факторов транскрипции, которые в итоге приводят к спецификации клеток; происходят в пределах общей цитоплазмы, как в раннем эмбрионе *Drosophila*.

Синцитий. Множество ядер, находящихся в общей цитоплазме, которое является результатом кариокинеза без цитокинеза или слияния клеток.

Синцитиотрофобласт. Популяция клеток трофобласта млекопитающих, которая подвергается митозу без цитокинеза, что приводит к образованию многоядерных клеток. Считается, что ткань синцитиотрофобласта способствует дальнейшему закреплению эмбриона в стенке матки путем переваривания ее ткани.

Сиртуины. Ферменты деацетилирования гистонов (сайленсеры хроматина), которые оберегают геном, предотвращая экспрессию генов в неправильное время и неправильных местах и помогая восстанавливать хромосомные разрывы. Могут играть важную роль в защите от преждевременного старения.

Скелетогенная мезенхима (первичная мезенхима). Клетки, образованные из первого яруса микромеров (больших микромеров) 60-клеточного эмбриона морского ежа. Выделяются в бластоцель и образуют личиночный скелет.

Склеротомы. Блоки мезодермальных клеток в вентрально-медиальной половине каждого сомита, которые будут дифференцироваться в позвонки, межпозвоночные диски (за исключением студенистых ядер) и ребра, в дополнение к мозговым оболочкам спинного мозга и кровеносным сосудам, которые обслуживают спинной мозг. Играют важную роль в формировании паттерна нервного гребня и моторных нейронов.

Слизистая оболочка. Гликопротеиновая сеть снаружи от желточной оболочки у многих видов; чаще всего используется для привлечения и/или активации сперматозоидов.

Слуховая ямка. Структура, сформированная во время морфогенеза внутреннего уха, когда слуховая плакода начинает инвагинировать, создавая углубление.

Слуховой колпачок. Структура, формирующаяся во время морфогенеза внутреннего уха, когда слуховая плакода инвагинирует, принимая форму чаши. Эта стадия развития внутреннего уха наступает после стадии слуховой ямки. Как только края слухового колпачка замыкаются, эту структуру называют слуховым пузырьком (отоцистой).

Слуховые плакоды. Парные эпидермальные утолщения; инвагинируют, образуя лабиринт внутреннего уха, нейроны которого образуют слуховые ганглии.

Случайный эпигенетический дрейф. Гипотеза о том, что вероятность накопления некорректного эпигенетического метилирования из-за ошибок, допущенных метилирующими и деметилирующими ферментами ДНК, может быть критическим фактором в старении и раковых заболеваниях.

Соединительная нейруляция. Переходный тип формирования нервной трубки в зоне между первичной нервной трубкой (которая лежит спереди от задних конечностей) и вторичной нервной трубкой (которая у млекопитающих расположена сзади от крестцовой области, а у рыб и земноводных находится только в хвостовой области).

Соленоиды. Структуры, созданные из плотно намотанных нуклеосом, стабилизированных гистоном H1, которые ингибируют транскрипцию генов, предотвращая доступ факторов транскрипции и РНК-полимераз к генам.

Сома. В пер. с греч. — тело. Может относиться к телу клетки (особенно нейронов) или к клеткам, которые формируют соматическую часть организма (за исключением половых клеток).

Соматические клетки. Клетки, из которых состоит организм, т. е. все клетки организма, которые не являются половыми клетками. Сравните с **Половые клетки**.

Соматоплевра. Комплекс париетальной мезодермы и вышележащей эктодермы.

Сомитная мезодерма. См. **Параксиальная мезодерма**.

Сомитогенез. Процесс сегментации параксиальной мезодермы с образованием сомитов, начинающийся краниально и распространяющийся каудально. Его составляющими являются: (1) периодичность; (2) образование щелей (для отделения сомитов); (3) эпителизация; (4) спецификация; (5) дифференциация.

Сомитомеры. Ранние пресомиты, состоящие из клеток параксиальной мезодермы, организованных в мутовки клеток.

Сомиты. Сегментные блоки мезодермы, формирующиеся из параксиальной мезодермы, примыкающей к осевой мезодерме (хорде). Каждый из них содержит основные компоненты: склеротом, образующий осевой скелет (позвонки и ребра), и дермомиотом, образую-

ший дерматом и миотом. Дерматом образует дерму спины, миотом — мускулатуру спины, грудной клетки и брюшного тела. Дополнительные предшественники мышц отделяются от бокового края дермомиотома и мигрируют в передние и задние конечности, образуя мышцы.

Сосудистая ткань. Проводящая ткань в сосудистых растениях, которая транспортирует жидкости и питательные вещества; ее основными компонентами являются ксилема и флоэма. См. также **Ксилема** и **Флоэма**.

Сперматиды. Гаплоидные сперматогенные клетки после второго мейотического деления. У млекопитающих сперматиды все еще связаны друг с другом цитоплазматическими мостиками, что способствует диффузии генных продуктов через цитоплазматические мостики.

Сперматогенез. Производство сперматозоидов.

Сперматогенные стволовые клетки. У млекопитающих группа стволовых клеток, которые будут формировать линию половых клеток, ведущую к сперматозоидам. Претерпевают митотические деления с неполной цитотомией, образуя кластеры сперматогониев.

Сперматогонии. Сперматогенные стволовые клетки. Когда сперматогоний прекращает делиться митотически, он становится первичным сперматоцитом и увеличивается до исходного размера.

Сперматогоний типа А. Сперматогенные стволовые клетки млекопитающих, которые подвергаются митозу и поддерживают популяцию сперматогониев типа А, а также генерируют сперматогонии типа В.

Сперматогоний типа В. Предшественники сперматоцитов и последние клетки сперматогенной линии млекопитающих, подвергающиеся митозу. Делятся один раз и генерируют первичные сперматоциты.

Сперматозоиды. Зрелые мужские гаметы.

Спермиогенез. Дифференцировка зрелых сперматозоидов из круглых гаплоидных сперматид.

Спецификаторы границ нервной пластинки. Набор транскрипционных факторов (например, *Distalless-5*, *Rax3* и *Rax7*), индуцируемых индуктивными сигналами нервной пластинки, которые придают пограничной области способность образовывать типы клеток нервного гребня и дорсальной нервной трубки. Индуцируют экспрессию спецификаторов нервного гребня.

Спецификаторы нервного гребня. Набор факторов транскрипции (например, *FoxD3*, *Sox9*, *Id*, *Twist* и *Snail*), индуцированных транскрипционными факторами, определяющими границу нервной пластинки, и специфицирующими будущие клетки нервного гребня.

Спецификация. Первая стадия коммитирования статуса клетки или ткани, на которой клетка или ткань способна дифференцироваться автономно (т. е. сама по себе) при помещении в среду, нейтральную по отношению к пути развития (например, чашку Петри). В то же время на этапе спецификации коммитирование клетки все еще обратимо. Предшествует стадии детерминации. Сравните с **Детерминация**.

Спиральное голобластическое дробление. Тип дробления, характерный для нескольких групп животных,

включая кольчатых червей, некоторых плоских червей и большинство моллюсков. Дробление происходит под косым углом к анимально-вегетативной оси и приводит к спиральному расположению дочерних бластомеров. Клетки соприкасаются друг с другом в большем количестве мест, чем клетки радиально дробящихся эмбрионов, что ведет к наиболее термодинамически стабильному способу упаковки.

Спиральный филлотаксис. Расположение боковых органов у растений, таких как листья или цветки в соцветии, при котором органы формируются последовательно вокруг вершины в соответствии с «золотым углом» Фибоначчи, составляющим 137,5 градусов между каждым органом.

Сплайсинг. Разрезание, реорганизация и повторное сшивание пре-мРНК в отдельные транскрипты (мРНК), которые кодируют разные белки, путем использования разных комбинаций потенциальных экзонов. См. также **Дифференциальный процессинг РНК**.

Сплайсинговые изоформы. Различные белки, которые кодируются одним и тем же геном и появляются в результате альтернативного сплайсинга.

Сплайсинговый сайленсер. Цис-действующая последовательность на пре-мРНК, которая исключает экзоны из последовательности мРНК.

Сплайсосома. Комплекс, состоящий из малых ядерных РНК (snRNA) и факторов сплайсинга, который связывается с сайтами сплайсинга и осуществляет сплайсинг пре-мРНК.

Спланхноплевра. Комплекс висцеральной мезодермы и подлежащей энтодермы. См. также **Висцеральная мезодерма**.

Спорофит. Диплоидная стадия роста в жизненном цикле растений и водорослей. Сравните с **Гаметофит**.

Спящая личинка. Метаболически дремлющая личиночная стадия у *C. elegans*. См. также **Диапауза**.

Сравнительная эмбриология. Изучение того, как анатомия изменяется при развитии разных организмов.

Средне-бластульный переход. Переход от быстрых ранних двухфазных (только фазы М и S) митотических делений эмбриона к стадии, характеризующейся: (1) митозами, которые включают в себя «переходные» стадии (G_1 и G_2) клеточного цикла; (2) асинхронностью клеточных делений; (3) транскрипцией новых (зиготических) мРНК, необходимых для гастрюляции и спецификации клеток. См. также **Материнско-зиготический переход**.

Средний мозг. См. **Мезэнцефалон**.

Стадия трилистника. Стадия развития некоторых спирально-дробящихся эмбрионов, на которой при первом делении дробления обособляется большая полярная лопасть и создается впечатление, что формируется три клетки, после чего она реабсорбируется обратно в бластомер CD.

Старение. Связанное со временем ухудшение физиологических функций, необходимых для выживания и размножения.

Стволовая клетка. Относительно недифференцированная клетка эмбриона, плода или взрослого организма, которая делится и производит: (1) одну клетку, которая сохраняет свой недифференцированный статус и остается в нише стволовых клеток; (2) вторую клетку, которая покидает нишу и может пройти один или несколько путей дифференцировки. См. также **Стволовые клетки взрослого организма**; **Эмбриональные стволовые клетки**.

Стволовые клетки взрослого организма (постнатальные стволовые клетки). Стволовые клетки в тканях зрелого органа. Стволовые клетки взрослого организма обычно участвуют в замещении и восстановлении тканей этого конкретного органа, образуя несколько характерных типов клеток. Сравните с **Плюрипотентные стволовые клетки взрослого организма**; **Эмбриональные стволовые клетки**.

Стволовые клетки волосяного фолликула. См. **Фолликулярные стволовые клетки**.

Стволовые клетки зародышевой линии. У *Drosophila* это производные полярных клеток (первичных половых клеток), которые асимметрично делятся, образуя другую стволовую клетку и дифференцированную дочернюю клетку, называемую цистобластом, которая, в свою очередь, продуцирует одну яйцеклетку и 15 питающих клеток.

Стволовые клетки костного мозга. См. **Мезенхимальные стволовые клетки**.

Стволовые клетки меланоцитов. Стволовые клетки взрослого организма, полученные из клеток туловищного нервного гребня; образуют меланобласты, находятся в зоне бугорка волосяного или перьевого фолликула и вызывают пигментацию кожи, волос и перьев.

Стволовые клетки, ограниченные в потенциях. Стволовые клетки, полученные из мультипотентных стволовых клеток и теперь способные генерировать только определенный тип клеток или набор типов клеток.

Стероидогенный фактор 1 (Sf1). Фактор транскрипции, который у млекопитающих необходим для формирования бипотенциальной гонады. Снижается в развивающемся яичнике, но остается на высоком уровне в развивающемся семеннике, маскулинизируя клетки Лейдига и Сертоли.

Стерробластула. Бластула, которая не имеет бластоцеля (или имеет очень маленький), например полученная в результате спирального дробления.

Стилопод. Проксимальные кости конечности позвоночных, прилегающие к стенке тела; плечевая кость передней конечности или бедренная кость задней конечности.

Столбик. Вытянутая часть пестика между рыльцем, воспринимающим пыльцу, и завязью, где расположена яйцеклетка.

Стомодеем. Инвагинация эктодермы в ротовой области эмбриона, которая встречается с энтодермой слепой кишечной трубки, образуя ротовую пластинку.

Стоп-кодон. См. **Кодон терминации трансляции**.

Стохастический. Случайный процесс, характеризующийся набором случайных величин, которые можно

анализировать статистически, но не всегда возможно прогнозировать.

Стромальный фактор 1 (stromal derived factor 1, SDF1). Хемоаттрактант. Секретируется, например, эктодермальными плакодами, привлекающими тем самым клетки черепного нервного гребня.

Студенистое ядро. Гелеобразная масса в центре межпозвонкового диска, происходящая из клеток хорды.

Субвентрикулярная зона (subventricular zone, SVZ). Область в головном мозге позвоночных, которая образуется в результате миграции клеток-предшественников в сторону от вентрикулярной зоны.

Субгерминальная полость. Пространство между бластодермой и желтком птичьих яиц, которое образуется в результате того, что клетки бластодермы поглощают воду из белка яйца и выделяют жидкость между бластодермой и желтком.

Субгранулярная зона (subgranular zone, SGZ). Область гиппокампа в головном мозге, которая содержит нейральные стволовые клетки, обеспечивая нейрогенез у взрослых особей в этой области.

Супрессор элонгации транскрипции. Репрессивный фактор транскрипции, который предотвращает связывание комплекса элонгации транскрипции с РНК-полимеразой II, приостанавливая транскрипцию.

Сурфактант. Секрет, содержащий специфические белки и фосфолипиды, например сфингомиелин и лецитин, который начинает вырабатываться в легких альвеолярными клетками II типа на очень поздних сроках беременности. Является поверхностно-активным веществом и позволяет альвеолярным клеткам касаться друг друга, не слипаясь.

Суспензор. Структура семян растений, которая связывает зародыш с питательными веществами внутри семени. Развивается из базальной клетки проэмбриона. См. также **Проэмбрион**.

Т

Т-бокс (Tbx). Специфичный ДНК-связывающий домен, обнаруженный в некоторых факторах транскрипции, в том числе в генах *T (Brachyury)*, *Tbx4* и *Tbx5*. Tbx4 и Tbx5 помогают специфицировать задние и передние конечности соответственно.

Текальные клетки. Клетки яичников млекопитающих, секретирующие стероидные гормоны, которые вместе с клетками гранулезы образуют овариальные фолликулы, окружающие яйцеклетки. Дифференцируются из мезенхимных клеток яичника.

Телоген. Фаза покоя цикла регенерации волосяного фолликула.

Телолецитальность. Свойство яиц (например, птиц и рыб), которые имеют на анимальном полюсе только одну небольшую область цитоплазмы, свободной от желтка.

Теломеразы. Комплекс ферментов, который может удлинить теломеры до их полной длины и сохранить целостность теломер.

Теломеры. Повторяющиеся последовательности ДНК на концах хромосом.

Тельсон. Хвостоподобная структура; задний сегмент большинства членистоногих, в том числе *Drosophila* и их личинок.

Телэнцефалон. Переднее подразделение проэнцефалона; в итоге сформирует полушария головного мозга.

Теория полевой организации тканей (TOFT). Гипотеза о возникновении рака, утверждающая, что канцерогенез является тканевым феноменом и обусловлен агентами, которые препятствуют межклеточной коммуникации и пролиферации клеток.

Теория половой плазмы. Первая проверяемая модель спецификации клеток, предложенная Вейсманом в 1888 г., согласно которой каждая клетка эмбриона развивается автономно. Вместо равнонаследственного деления предполагает деление хромосом таким образом, что в разные клетки попадают разные хромосомные детерминанты. Постулируется, что только ядра клеток, которым суждено стать половыми клетками (гаматами), содержат все возможные типы детерминант. Ядра всех других клеток будут иметь только ограниченное подмножество исходного набора детерминант.

Теория систем. Согласно этому подходу, организм представляет собой совокупность компонентных процессов, объединенных посредством взаимодействий. Может характеризоваться шестью принципами: (1) зависимость от контекста свойства; (2) зависимость от уровня свойства и эмерджентность; (3) гетерогенность причин; (4) интеграция; (5) модульность и помехоустойчивость; (6) гомеорезис (стабильность во время изменений).

Теория соматических мутаций. Гипотеза возникновения рака, утверждающая, что канцерогенез — клеточное явление, вызванное мутациями в исходно нормальных клетках, индуцирующими их пролиферировать.

Тератогенез. См. **Тератогены**.

Тератогены. В пер. с греч. — создатели монстров. Экзогенные агенты, вызывающие сбои в развитии, и приводящие к тератогенезу, т. е. образованию врожденных дефектов.

Тератокарцинома. Опухоль, происходящая из злокачественных первичных половых клеток и содержащая популяцию недифференцированных стволовых клеток (эмбриональная карцинома), которая имеет биохимические свойства и потенциалы, аналогичные внутренней клеточной массе. Клетки эмбриональной карциномы могут дифференцироваться в самые разные ткани, включая кишечный и дыхательный эпителий, мышцы, нервы, хрящи и кости.

Тератология. Наука, изучающая врожденные дефекты и то, как факторы окружающей среды нарушают нормальное развитие. См. также **Тератогены**.

Терминатор. См. **Последовательность терминации транскрипции**.

Термотаксис. Направленная миграция по градиенту температуры.

Тестостерон. Андроген, мужской стероидный гормон. У млекопитающих начинает секретироваться в семен-

никах плода и маскулинизирует его, стимулируя образование полового члена, системы мужских протоков, мошонки и других частей мужского организма, а также подавляя развитие зачатков молочной железы.

Тетрада. См. **Бивалент**.

Тетраподы (четвероногие). Группа позвоночных, включающая амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих. Произошла от лопастеперых рыб.

Течка. См. **Эструс**.

Тироксин (Т₄). Гормон щитовидной железы, содержащий четыре молекулы йода; превращается в более активную форму Т₃ путем удаления одной молекулы йода. Увеличивает скорость основного обмена в клетках. Иницирует метаморфоз у земноводных.

Тканевая инженерия. Подход к регенеративной медицине, при котором из материала, напоминающего внеклеточный матрикс, или из децеллюляризованного внеклеточного матрикса донора создают каркас, который засевают стволовыми клетками и используют для замены органа или части органа.

Тотипотентность. В пер. с лат. — способен на все. Способность определенных стволовых клеток формировать все структуры организма; например, ранние бластомеры, млекопитающих (до стадии восьми клеток) могут образовывать как клетки трофобласта, так и клетки-предшественники эмбрионов. Сравните с **Плюрипотентность**.

Тракт оттока. Артериальный конус и артериальный ствол развивающегося сердца; становится основанием аорты и легочных артерий.

Транзитные амплифицирующие клетки. См. **Клетки-предшественники**.

Трансактивирующий домен. Домен фактора транскрипции, который активирует или подавляет транскрипцию гена, с промотором или энхансером которого он связан, обычно способствуя взаимодействию фактора транскрипции с белками, участвующими в связывании РНК-полимеразы, или с ферментами, которые модифицируют гистоны.

Трансген. Экзогенная ДНК или ген, введенный в геном клетки путем экспериментальных манипуляций.

Трансдифференцировка. Преобразование одного типа клеток в другой.

Транскриптом. Все РНК-транскрипты (мРНК), экспрессируемые в организме или конкретном типе ткани или клеток.

Транскрипционные корегуляторы. Белки, рекрутируемые факторами транскрипции, которые вносят изменения в структуру хроматина, либо усиливая, либо подавляя транскрипцию специфических генов.

Транскрипционный фактор. Белок, который связывается с ДНК с точным распознаванием последовательности конкретных промоторов, энхансеров или сайленсеров.

Транскрипция. Процесс синтеза РНК на матрице ДНК.

Трансляция. Процесс, в котором кодоны мРНК транслируются в аминокислотную последовательность полипептидной цепи.

Транс-регуляторные элементы. Растворимые молекулы, гены которых расположены в других местах генома; связываются с *цис*-регуляторными элементами. Обычно они являются факторами транскрипции или микроРНК.

Трансформирующие факторы роста β (transforming growth factor β , TGF β). Суперсемейство, включающее более 30 структурно связанных членов группы паракринных факторов. Белки, кодируемые генами суперсемейства TGF β , процессируются так, что карбоксиконцевая область содержит зрелый пептид. Эти пептиды димеризуются в гомодимеры (с такими же пептидами) или гетеродимеры (с другими пептидами TGF β) и секретируются из клетки. Суперсемейство TGF β включает семейства TGF β , активина, морфогенетических белков кости (BMP), Vg1 и другие белки, в том числе глиальный нейротрофический фактор (GDNF; необходим для дифференцировки почки и кишечных нейронов) и антимюллеров гормон (АМН; участвует в определении пола млекопитающих).

Трахеопищеводный свищ. Неправильная связь между кишечной трубкой (пищеводом) и дыхательной трубкой (трахеей), которая может возникнуть у детей, когда разделение этих двух трубок ларинготрахеальной бороздкой во время эмбрионального развития не завершено. Это состояние необходимо исправить хирургическим путем, чтобы ребенок мог нормально дышать и глотать. См. также **Ларинготрахеальная бороздка**.

Трехслойные. См. **Билатерии**.

Трийодтиронин (Т₃). Более активная форма гормона щитовидной железы, вырабатываемая путем удаления молекулы йода из тироксина (Т₄). См. также **Тироксин**.

Трисомия 21-й хромосомы. Состояние (у людей) наличия трех копий хромосомы 21 (пример анеуплоидии). Причина синдрома Дауна.

Тройничные плакоды. У позвоночных это пара промежуточных черепных плакод, которые подразделяются на зрительные и максомандибулярные плакоды и генерируют дистальные нейроны парных тройничных ганглиев, сенсорные ганглии парного V (тройничного) черепного нерва.

Трофобласт. Внешние клетки раннего эмбриона млекопитающего (т. е. морулы и бластоцисты), которые будут связываться с маткой. Клетки трофобласта образуют хорион (эмбриональная часть плаценты). См. также **Трофобластодерма**.

Трофоциты. См. **Питающие клетки**.

Трофобластодерма. У эмбрионов млекопитающих это наружный слой клеток бластоцисты, которые окружают внутреннюю клеточную массу и бластоцель; дают начало эмбриональной части плаценты.

Трубчатая клетка. См. **Вегетативная клетка**.

Тубулин. Димерный белок, который полимеризуется с образованием микротрубочек. Микротрубочки — основной компонент цитоскелета; они являются основой центриолей и митотического веретена, а также базальных телец и аксоном ресничек и жгутиков.

Туловищный нервный гребень. Клетки нервного гребня, мигрирующие из туловищной области; дают начало

ганглиям дорсальных корешков, содержащих сенсорные нейроны, симпатическим ганглиям, мозговому веществу надпочечников, нервным кластерам, окружающим аорту, и шванновским клеткам, если они мигрируют по вентральному пути; дают начало меланоцитам спины и живота, если мигрируют по дорсально-латеральному пути.

Тычинка. Мужской орган цветка; обычно содержит тычиночную нить и пыльник, производящий пыльцу.

У

Узелок. Гомолог гензеновского узелка у млекопитающих.

Улитка. Часть внутреннего уха амниот, вовлеченная в слуховую чувствительность. Улитка млекопитающих происходит от слуховой плакоды; имеет спиральную форму и содержит Кортиев орган, слуховую сенсорную структуру.

Унипотентные стволовые клетки. Стволовые клетки, которые генерируют только один тип клеток, например сперматогонии семенников млекопитающих, которые генерируют только сперматозоиды.

Уретральные складки. См. **Лабioskротальные складки**.

Устьица. Поры в эпидермисе листьев и других органов растений, обеспечивающие газообмен. Каждая пора ограничена двумя защитными клетками, которые контролируют ее размер, открывая и закрывая устьице в ответ на условия окружающей среды.

Ф

Фактор активации митоза (mitosis promoting factor, MPF). Регулятор, состоящий из циклина В и циклин-зависимой киназы (CDK); необходим для инициации вступления в митотическую (М) фазу клеточного цикла как в мейозе, так и в митозе.

Фактор обмена GTP. При активации сигнальных путей рецепторных тирозинкиназ обменивает фосфат, который превращает связанный с G-белком ГДФ в ГТФ, активируя G-белок. См. также **Рецепторные тирозинкиназы**.

Фактор роста. Секретируемый белок, который связывается с рецептором и инициирует сигналы, способствующие делению и росту клеток.

Фактор роста гепатоцитов (рассеивающий фактор). Паракринный фактор, секретируемый звездчатыми клетками печени, который позволяет гепатоцитам повторно входить в клеточный цикл во время компенсаторной регенерации.

Фактор роста нервов. Нейротрофин, который участвует главным образом в росте нервных клеток. Освобожденный от потенциальных тканей-мишеней, он работает на коротких дистанциях как хемотаксический фактор или хеморепульсивный фактор для направленного роста аксонов. Играет важную роль в избирательном выживании различных групп нейронов.

Фактор роста фибробластов 9 (fibroblast growth factor 9, Fgf9). Фактор роста, участвующий в развитии семенников у млекопитающих, стимулирующий пролиферацию и дифференцировку клеток Сертоли и поддержание ими экспрессии Sox9. Подавляет сигнал Wnt4,

который в противном случае вызывает развитие яичников; участвует в развитии метанефрических почек, способствуя развитию популяции стволовых клеток для нефронов. См. также **Факторы роста фибробластов**.

Фактор стволовых клеток (stem cell factor, SCF). Паракринный фактор, играющий важную роль для поддержания определенных стволовых клеток, включая гемопоэтические, сперматогенные и пигментные стволовые клетки. Связывается с рецептором Kit.

Факторы роста и дифференцировки. См. **Паракринные факторы**.

Факторы роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF). Семейство паракринных факторов, регулирующих пролиферацию и дифференцировку клеток.

Факторы роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF). Семейство белков, участвующих в васкулогенезе, которое включает несколько VEGF, а также фактор роста плаценты. Считается, что каждый VEGF позволяет дифференцировать ангиобласты и увеличивать их численность с образованием эндотелиальных трубок. Важны для ангиогенеза.

Факторы, связанные с транскрипцией. Белки, которые стабилизируют РНК-полимеразу на промоторе гена и позволяют ему инициировать транскрипцию.

Факторы сплайсинга. Белки, которые связываются с сайтами сплайсинга или прилегающими к ним областями.

Фарингула. Стадия, соответствующая поздней нейруле позвоночных.

Фенотипическая гетерогенность. Явление, когда одна и та же мутация вызывает разные фенотипы у разных особей.

Фенотипическая пластичность. Способность организма реагировать на воздействие окружающей среды изменением формы, состояния, движения или интенсивности деятельности.

Феромоны. Секретируемые особью химические вещества, которые способствуют коммуникации с другой особью (другими особями). Феромоны распознаются вомероназальным органом многих видов млекопитающих и играют важную роль в сексуальном поведении.

Фетальный алкогольный синдром. Состояние детей, рожденных от алкоголизированных матерей, характеризуется небольшим размером головы, специфическими чертами лица и небольшим мозгом, в котором часто заметны нарушения нейрональной и глияльной миграции. Является наиболее распространенным врожденным синдромом умственной отсталости. Другой термин, **Фетальное расстройство алкогольного спектра**, охватывает менее заметные поведенческие эффекты у детей, подвергавшихся пренатальному воздействию алкоголя.

Фетальный период. См. **Плодный период**.

Фибронектин. Очень большой (460 кДа) димерный гликопротеин, синтезируемый многими типами клеток и секретируемый во внеклеточный матрикс. Функционирует как общая адгезивная молекула, связывая клетки друг с другом и с другими компонентами внеклеточ-

ного матрикса, такими как коллаген и протеогликаны, и обеспечивает субстрат для миграции клеток.

Филлотаксис. Способ расположения листьев вдоль стебля растения.

Филоподии. Длинные тонкие отростки, содержащие микрофиламенты; путем выпуска, прикрепления и сокращения филоподий клетки могут передвигаться. Появляются, например, у мигрирующих клеток мезенхимы эмбрионов морского ежа, у конусов роста нервов, у концевых клеток при формировании кровеносных сосудов.

Филотипическая стадия. Стадия, которая характеризует тип животных и которая, по-видимому, относительно инвариантна и ограничивает эволюцию типа. Пример: поздняя нейрула (фарингула) позвоночных.

Фитогормоны. Гормоны растений, например ауксины.

Флоэма. Трубки у сосудистых растений, по которым перемещаются сахара, полученные в результате фотосинтеза, наряду с другими метаболитами из источников в накопители — главным образом из листьев в нефотосинтезирующие части растения.

Флуоресцентные красители. Соединения, такие как флуоресцеин и зеленый флуоресцентный белок (GFP), которые излучают яркий свет на определенной длине волны при возбуждении ультрафиолетовым светом.

Фокальные адгезионные контакты. Места контактов поверхностной мембраны мигрирующих клеток с внеклеточным матриксом, опосредуемых связями между актином, интегрином и внеклеточным матриксом.

Фолликул. Небольшая группа клеток вокруг полости. Например, овариальный фолликул млекопитающих состоит из одной яйцеклетки и окружающих ее клеток гранулезы и теки; волосяной фолликул, перьевой фолликул, в которых формируются волос или перо.

Фолликулостимулирующий гормон (follicle stimulating hormone, FSH). Пептидный гормон, секретируемый гипофизом млекопитающих; способствует развитию овариальных фолликулов и сперматогенезу.

Фолликулярные стволовые клетки. Мультипотентные постнатальные стволовые клетки, которые находятся в области бугорка наружного корневого влагалища волосяного фолликула; формируют стержень волоса и волосяную сумку.

Фоллистатин. Паракринный фактор с активностью организатора, ингибитор как активина, так и BMP; индуцирует эктодерму стать нервной тканью.

Фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат (PIP₂). Мембранный фосфолипид, который в IP₃-сигнальном пути расщепляется ферментом фосфолипазой C с образованием двух активных соединений: IP₃ и диацилглицерина (DAG). Путь IP₃ активируется во время оплодотворения, запускает медленный блок полиспермии и активирует яйцеклетку к развитию.

Фосфолипаза C (PLC). Фермент в IP₃-сигнальном пути, который расщепляет мембранный фосфолипид фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PIP₂) с образованием IP₃ и диацилглицерина (DAG).

Фосфолипаза С дзета (PLC ζ). Растворимая форма фосфолипазы С, обнаруженная в головке сперматозоидов млекопитающих; выделяется при слиянии гамет; запускает в яйце сигнальный путь IP₃, который приводит к высвобождению Ca²⁺ и активации яйца.

Фрагмопласт. Структура, которая образуется между двумя дочерними ядрами в делящихся клетках растений. Состоит из наполненных целлюлозой везикул, микротрубочек, микрофиламентов и эндоплазматического ретикулума и создает клеточную стенку между двумя дочерними клетками, осуществляя цитокинез.

Фронт детерминации. Эквивалент «фронта волны» в волновой модели формирования границ сомитов каудальным градиентом концентрации FGF в пресомитной мезодерме от высокой в каудальной части к низкой в ростральной.

Фронтоназальный вырост. Черепной выступ, образованный клетками нервного гребня из среднего мозга и 1-го и 2-го ромбомеров заднего мозга, который образует лоб, середину носа и первичное небо.

Х

Хаб. Регуляторное микроокружение в семенниках *Drosophila*, где расположены стволовые клетки сперматозоидов.

Харофитовые водоросли (Charophyta). Группа пресноводных зеленых водорослей, древний представитель которой, как полагают, был общим предком всех наземных растений (эмбриофитов).

Хвостатые (Urodela). Группа амфибий, в которую входят саламандры и тритоны. Сравните с **Бесхвостые**.

Хвостовая прогениторная зона. Область в хвостовой части эмбрионов позвоночных, состоящая из мультипотентных клеток-предшественников нейромезодермы. См. также **Предшественники нейромезодермы**.

Хемоаттрактант. Биохимическое соединение, которое заставляет клетки двигаться к нему.

Хемоаффинная гипотеза. Гипотеза, выдвинутая Сперри в 1965 г., о том, что нервные клетки в мозге приобретают отдельные химические метки, которые отличают их друг от друга, и что они управляют сборкой и организацией нервных цепей в мозге.

Хемотаксис. Движение клетки по химическому градиенту, например движение сперматозоида в направлении химического вещества (хемоаттрактанта), выделяемого яйцеклеткой.

Хиазмы. Точки сцепления гомологичных хромосом во время мейоза, которые, как полагают, являются областями, где происходит кроссинговер.

Химера. Организм, состоящий из клеток двух особей.

Химерный зародыш. Эмбрион, составленный из тканей более чем одного генетического источника.

Хоанобластея. Предполагаемый предок всех метазой (многоклеточных животных); предполагается, что это были сферы, состоящие из хоаноцитов, которые жили в открытом океане.

Хоанофлагелляты. Группа одноклеточных и колониальных свободноживущих эукариот. Клетки имеют ту же основную структуру, что и хоаноциты губок, с центральным жгутиком, окруженным воротничком микроворсинок. Считается, что древние хоанофлагелляты были общим предком всех метазой. См. также **Хоанобластея**.

Хоаноциты. Тип клеток губок, которые содержат центральный жгутик, окруженный воротничком микроворсинок; хоаноциты приводят в движение поток воды через губку, а также функционируют как мультипотентные стволовые клетки во время регенерации губки.

Хозяин. Более крупный организм в симбиотических отношениях, в котором один из вовлеченных организмов намного больше другого, и меньший организм может жить на поверхности или внутри тела более крупного. Относится также к организму, получающему трансплантат от донора при трансплантации ткани.

Холистический органицизм. Философское представление о том, что свойства целого не могут быть предсказаны исключительно из свойств его составных частей и что свойства частей определяются их отношением к целому. Оказало большое влияние на биологию развития.

Хоминг. Способность клетки мигрировать и находить свое тканеспецифичное место назначения.

Хондрогенез. Формирование хряща, в котором хондроциты дифференцируются из конденсированной мезенхимы.

Хондроцитоподобные остеобласты. Клетки черепного нервного гребня, проходящие ранние стадии интрамембранозного окостенения; подавляют Runx2 и начинают экспрессировать ген *osteopontin*, приобретая фенотип, схожий с развивающимся хондроцитом.

Хондроциты. Хрящевые клетки.

Хорда. Временная мезодермальная структура в самой дорсальной части эмбриона, которая играет важную роль в индукции и разметке нервной системы. Характерна для хордовых.

Хордовые (Chordata). Животные, у которых на определенном этапе жизненного цикла есть хорда и спинной нервный шнур или нервная трубка.

Хордомезодерма. Осевая мезодерма хордового зародыша, образующая хорду.

Хориоаллантоис. Образуется у некоторых видов амниот, таких как птицы, в результате слияния мезодермы аллантоиса с мезодермой хориона. Эта богатая сосудами оболочка имеет важное значение для развития птиц и отвечает за транспорт кальция из скорлупы в зародыш для формирования костей.

Хорион. Внезародышевая оболочка эмбрионов амниот, необходимая для газообмена. Сформирована внезародышевой соматоплеврой. Хорион у птиц и рептилий прилегает к скорлупе, обеспечивая газообмен между яйцом и окружающей средой; формирует эмбриональную/плодную часть плаценты у млекопитающих.

Хроматида. Половина митотической профазной хромосомы; две дублирующие «сестринские» хроматиды, которые скреплены друг с другом кинетохором.

Хроматин. Комплекс ДНК и белка, в котором содержатся эукариотические гены.

Хромосомы. Структуры в клетке, которые содержат генетический материал в форме дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). У эукариот содержатся в ядре и состоят из ДНК и белков; перед делением клетки конденсируются.

Хрусталиковая плакода. Парное утолщение эпидермиса, индуцированное подлежащим глазным бокалом, инвагинирующее и образующее хрусталиковый пузырек, который дифференцируется во взрослый прозрачный хрусталик глаза, через который на сетчатку попадает свет.

Хрусталиковый пузырек. Пузырек, который образуется из хрусталиковой плакиды и дифференцируется в хрусталик. Индуцирует вышележащую эктодерму дифференцироваться в роговицу, а внутреннюю сторону глазного бокала — в нейросетчатку.

Ц

Цветочные MADS-box-гены. Гены цветковых растений, которые кодируют MADS-box-факторы транскрипции, участвующие в развитии цветка. MADS-box представляет собой консервативную последовательность, которая кодирует специфичный ДНК-связывающий домен.

Целлюляризация. Процесс формирования отдельных клеток из многоядерной клетки (синцития) путем разделения ядер клеточными мембранами. Пример: во время раннего развития у эмбриона *Drosophila* синцитиальная бластодерма превращается в клеточную бластодерму, когда клеточные мембраны растут внутрь между периферическими ядрами, отделяя клетки друг от друга и от внутренней желточной цитоплазмы.

Целом. Пространство между висцеральной мезодермой и париетальной мезодермой, которое становится полостью тела. У млекопитающих целом подразделяется на плевральную, перикардальную и брюшную полости.

Центральная догма. Объяснение передачи информации, закодированной в ДНК для производства белков: ДНК транскрибируется в РНК, которая затем транслируется в белки.

Центральная нервная система (ЦНС). Головной и спинной мозг позвоночных.

Центролецитальный. Тип яйца, например насекомых, имеющего желток в центре и дробящегося поверхностно.

Центромера. Область хромосомы, где сестринские хроматиды прикреплены друг к другу кинетохором.

Центры организации микротрубочек. Клеточная структура эукариот, которая полимеризует тубулин в микротрубочки. Они имеют решающее значение при формировании ресничек, жгутиков и веретен мейотического и митотического делений.

Цефалический. Имеющий отношение к голове.

Циклин-зависимая киназа. Малая субъединица фактора, стимулирующего митоз (MPF), активирующая митоз. Фосфорилирует несколько белков-мишеней, включая гистоны, белки ламина ядерной оболочки и регуляторную субъединицу цитоплазматического миозина, что приводит к конденсации хроматина, деполимеризации ядерной оболочки и организации митотического веретена. Для функционирования требуется циклин В.

Циклический аденозин-3',5'-монофосфат (цАМФ). Важный компонент нескольких внутриклеточных сигнальных каскадов, а также растворимое хемотаксическое вещество, которое направляет агрегацию микса-мембранной стадии *Dictyostelium*.

Циклооксигеназа-2 (COX2). Фермент, который синтезирует простагландины из арахидоновой кислоты.

Циклопия. Врожденная патология, при которой развивается только один глаз. Обусловлена мутациями в генах, кодирующих либо *Sonic hedgehog*, либо ферменты синтеза холестерина, или определенными химическими веществами, которые нарушают биосинтез холестерина.

Цилиарное тело. Сосудистая структура на стыке между сетчаткой и радужной оболочкой, которая выделяет водянистую влагу.

Цинлин В. Большая субъединица фактора, стимулирующего митоз (MPF), обладающая циклической активностью, являющейся ключом к митотической регуляции. Накапливается во время S-фазы и разрушается после того, как клетки достигли М-фазы клеточного цикла. Является регулятором малой субъединицы MPF, циклин-зависимой киназы.

Цис-регуляторные элементы. Регуляторные элементы (промоторы и энхансеры), находящиеся на том же участке ДНК, что и ген, который они регулируют.

Цистобласты. Клетки *Drosophila*, полученные в результате асимметричного деления стволовых клеток зародышевой линии. Каждый цистобласт подвергается четырем митотическим делениям с неполным цитокинезом и образует кластер из 16 цистоцитов (одна яйцеклетка и 15 питающих клеток), соединенных кольцевыми каналами.

Цитокинез. Деление цитоплазмы клетки на две дочерние клетки. Механическим агентом цитокинеза является сократительное кольцо микрофиламентов из актина и моторного белка миозина. Каждая дочерняя клетка получает одно из ядер, появившихся при ядерном делении (кариокинезе).

Цитокины. Паракринные факторы, играющие важную роль в клеточной сигнализации и иммунном ответе. Во время кроветворения цитокины концентрируются во внеклеточном матриксе стромальных (мезенхимных) клеток в местах гемопоэза и участвуют в образовании клеток крови и лимфоцитов.

Цитонемы. Специализированные филоподиальные отростки, которые тянутся из клетки (иногда более чем на 100 мкм) для контакта с другой клеткой, продуцирующей паракринный фактор. Паракринные факторы

могут достигать клеток-мишеней путем присоединения к рецепторам на кончиках цитонем и перемещения по всей длине цитонем до тела клеток-мишеней. Цитонема может также простирается от клетки, продуцирующей паракринный фактор, для установления контакта с клеткой-мишенью.

Цитоплазматическая локализация мРНК. Пространственная регуляция трансляции мРНК, опосредованная: (1) диффузией и локальным закориванием; (2) локализованной защитой; (3) активным транспортом по элементам цитоскелета.

Цитоплазматические детерминанты. Факторы в цитоплазме яйца, которые определяют путь клетки; это молекулы, чаще всего транскрипционные факторы, которые регулируют экспрессию генов. При автономной спецификации они распределяются между различными бластомерами раннего эмбриона. См. также **Цитоплазматические факторы детерминации**.

Цитоплазматические мостики. Непрерывность между соседними клетками, которая возникает в результате неполного цитокинеза, например во время гаметогенеза.

Цитоплазматические факторы детерминации. Факторы в цитоплазме клетки, которые определяют ее путь. Пример: в синцитиальной бластомере эмбриона *Drosophila* генерируются градиенты различных цитоплазматических факторов детерминации, определяющие потенциал клеток вдоль передне-задней оси.

Цитоплазматический белок, связывающий элемент полиаденилирования (СРЕВ). Белок, который связывается с 3'-UTR мРНК и помогает контролировать трансляцию. Будучи фосфорилированным, он позволяет удлинять полиадениновый (полиА) хвост на мРНК.

Цитотрофобласт. Внезародышевый эпителий млекопитающих, состоящий из исходных клеток трофобласта. Прикрепляется к эндометрию с помощью молекул адгезии и у видов с инвазивной плацентой, например у мыши и человека, секретирует протеолитические ферменты, которые позволяют ему проникать в стенки матки и реконструируют маточные кровеносные сосуды таким образом, чтобы материнская кровь омывала кровеносные сосуды плода.

Ч

Чашелистики. Внешние органы цветка, обычно защитные и фотосинтезирующие, которые окружают внутренние, генеративные части цветка.

Чередование поколений. Жизненный цикл растений, в котором гаплоидная многоклеточная стадия, продуцирующая гаметы (гаметофит), чередуется с диплоидной многоклеточной стадией, продуцирующей споры (спорофит).

Черепной (цефалический) нервный гребень. Клетки нервного гребня в области будущей головы, которые мигрируют и производят черепно-лицевую мезенхиму, дифференцирующуюся в хрящи, кости, черепные нейроны, глию и соединительную ткань лица. Эти клетки проникают также в глоточные дуги и карманы, образуя

клетки тимуса, одонтобласты зачатков зубов, а также кости среднего уха и челюсти.

Черепные сенсорные плакоды (черепные эктодермальные плакоды). Утолщения эктодермы, которые образуются в головной области эмбриона позвоночных; включают обонятельные, слуховые и хрусталиковые плакоды, а также плакоды, которые дают начало сенсорным нейронам различных черепных нервов.

Четвероногие. См. **Тетраподы**.

Ш

Шванновские клетки. Тип глиальных клеток периферической нервной системы, образующих миелиновую оболочку, которая позволяет быстро передавать электрические импульсы вдоль аксона.

Шейка. Участок жгутика сперматозоида около головки, которая содержит закрученную митохондрию, генерирующую АТФ, необходимую для работы динеиновой АТФазы и поддержания подвижности сперматозоида.

Шизоцельный. Тип формирования целома путем раздувания полостей в ранее цельном шнуре мезодермальных клеток. Типичен для первичноротых. См. также **Энтероцельный**.

Шпемановский организатор. См. **Организатор**.

Щ

Щель Браше. Область внеклеточного матрикса, которая при гастрюляции амфибий отделяет эктодерму от ввернувшейся мезендодермы.

Щиток. См. **Зародышевый щиток**.

Э

Эволюционная биология развития (evo-devo). Модель эволюции, которая объединяет генетику развития и популяционную генетику и объясняет происхождение биоразнообразия.

Экваториальная область. Соединение между внутренней мембраной акросомы и поверхностной мембраной сперматозоида у млекопитающих. Она подвергается акросомной реакции и является местом, где происходит слияние мембран сперматозоида и яйцеклетки.

Экдизозои. Одна из двух основных групп первичноротых; характеризуется наличием экзоскелета и периодическими линьками. Членистоногие (включая насекомых и ракообразных) и нематоды (круглые черви, включая модельный организм *C. elegans*) представляют собой две наиболее значительные группы. См. также **Лофотрохозои**.

Экдизон. Стероидный гормон насекомых, секретируемый проторакальными железами, который модифицируется в периферических тканях, превращаясь в активный гормон линьки 20-гидроксиэкдизон. Имеет решающее значение для метаморфоза насекомых.

Экзина. Наружная оболочка пыльцевого зерна или споры. Чрезвычайно устойчива к разложению.

Экзон. Область или области ДНК, которые кодируют белок. Сравните с **Инtron**.

Экзосомы. Тип мембранных внеклеточных везикул, которые высвобождаются из клеток и могут содержать белки и РНК, способные влиять на развитие других клеток, которые их получают.

Экологическая интеграция. Описывает влияние сигналов от внешней среды, окружающей эмбрион, плод или личинку, на их развитие.

Экологическая эволюционная биология развития (эко-эво-дево). Наука, изучающая способы, посредством которых изменения развития, инициируемые окружающей средой, могут влиять на эволюцию. В первую очередь это касается эволюционных аспектов симбиоза развития, пластичности развития и формирования ниши.

Экоморфа. См. **Морфа**.

Экстантный. Существующие до настоящего времени, например, ныне живущие виды.

Эктодерма. От греч. «эктос» — снаружи. Клетки, которые остаются на наружной (амфибии) или дорсальной (птицы, млекопитающие) поверхности эмбриона после гастрюляции. Один из трех зародышевых листков, образующий нервную систему из нервной трубки и нервного гребня; генерирует эпидермис, покрывающий эмбрион.

Эктодермальные плакоды. Утолщения поверхностной эктодермы у зародышей, которые становятся зачатками многочисленных органов. Включают плакоды черепа, плакоды эктодермальных придатков.

Эктодермальные придатки. Структуры, которые формируются из определенных областей эпидермальной эктодермы и подлежащей мезенхимы посредством ряда индукционных процессов; включают в себя волосы, чешуйки, щитки (например, оболочки черепаховых раковин), зубы, потовые железы, молочные железы и перья.

Эктодисплазиновый каскад. Генный каскад, специфичный для формирования кожного придатка. У позвоночных с дисфункциональными белками этого каскада проявляется синдром ангидротической эктодермальной дисплазии, характеризующийся отсутствием или уродством кожных придатков (волос, зубов и потовых желез).

Эмалевый узелок. Сигнальный центр для развития зуба, группа клеток, индуцируемых в эпителии мезенхимой, происходящей из нервного гребня, которая секретирует паракринные факторы, образующие кончик зуба.

Эмбриогенез. Этапы развития между оплодотворением и вылуплением (или рождением).

Эмбриология. Наука о развитии животных от оплодотворения до вылупления или рождения.

Эмбрион. Развивающийся организм до рождения или вылупления. У людей термин «эмбрион» обычно относится к ранним стадиям развития, начиная с оплодотворенной яйцеклетки и до конца органогенеза (первые 8 недель беременности). Далее развивающегося человека называют плодом до его рождения.

Эмбриональная ось. Любая из позиционных осей зародыша; включает передне-заднюю (от головы к хвосту), дорсально-вентральную (от спины к брюху) и правую-левую оси.

Эмбриональные зародышевые клетки. Плюрипотентные эмбриональные клетки со свойствами внутренней клеточной массы, полученные из первичных половых клеток, которые были обработаны определенными паракринными факторами для поддержания пролиферации.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). Плюрипотентные стволовые клетки, полученные из внутренней клеточной массы млекопитающих, которые способны генерировать все типы клеток организма (за исключением половых клеток и трофоэктодермы. — *Прим. ред. перевода*.).

Эмбриональный период. В развитии человека первые 8 недель внутриутробного развития до плодного периода; время, в течение которого формируется большинство систем органов.

Эмбриональный щиток. Локализованное утолщение на будущей дорсальной стороне зародыша рыбы; функционально эквивалентен дорсальной губе бластопора амфибий.

Эмбриональный эпибласт. Клетки эпибласта у млекопитающих, которые вносят вклад в собственно эмбрион, отделены от клеток эпибласта, выстилающих амниотическую полость.

Эмбриофиты. См. **Высшие растения**.

Эмерджентные свойства. См. **Свойства, зависящие от уровня**.

Эндобласт. См. **Вторичный гипобласт**.

Эндокард. Внутренняя оболочка камер сердца, происходящая из полей сердца.

Эндокардиальные подушки. Ткань в развивающемся сердце позвоночного, происходящая из эндокарда. Образует перегородки, которые делят атриально-вентрикулярную область первоначально трубчатого сердца на левое и правое предсердия и желудочки у амниот; у амфибий разделяет два предсердия (желудочек остается неразделенным); у рыб все камеры остаются неразделенными. Эндокардиальные подушки образуют также атриовентрикулярные клапаны.

Эндокринные деструкторы. См. **Эндокринные дизрапторы**.

Эндокринные дизрапторы (эндокринные деструкторы). Гормонально активные соединения в окружающей среде (например, DES; BPS; ароматаза), которые могут оказывать серьезное пагубное влияние на развитие, особенно гонад. Многие эндокринные дизрапторы являются также обезогенами (вызывают усиленное формирование жировых клеток и накопление жира).

Эндокринные факторы. Гормоны, которые оказывают свое влияние, перемещаясь к клеткам-мишеням и тканям-мишеням с кровью.

Эндометрий. Внутренняя слизистая оболочка матки.

Эндосимбиоз. В пер. с греч. — совместно живущие внутри. Описывает ситуацию, в которой одна клетка живет внутри другой клетки или один организм живет в другом.

Эндосома. Мембранный пузырь, который клетка интернализует посредством эндоцитоза. Интернализация

лиганд-рецепторных комплексов в эндосомах является распространенным механизмом в паракринной сигнализации.

Эндосперм. Триплоидная ткань семени покрытосеменных растений; обеспечивает развивающийся зародыш питательными веществами.

Эндостальные остеобласты. Остеобласты, выстилающие костный мозг и отвечающие за создание ниши, которая привлекает гемопоэтические стволовые клетки, предотвращает апоптоз и поддерживает их в состоянии пластичности.

Эндотелий. Однослойный эпителий, выстилающий кровеносные сосуды.

Эндотелины. Небольшие пептиды, секретируемые кровеносными сосудами; играют роль в сокращении сосудов, а также могут направлять миграцию определенных клеток нервного гребня и рост определенных симпатических аксонов, которые имеют рецепторы эндотелина, например направленный рост нейронов от верхних шейных ганглиев до сонной артерии.

Эндохондральное окостенение. Формирование кости, при котором мезодермальная мезенхима становится хрящом, а хрящ заменяется костью. Характерно для костей туловища и конечностей.

Энергиды. У *Drosophila* — ядра на периферии синцитиальной бластодермы и связанные с ними островки цитоплазмы с цитоскелетными белками.

Энтероцельный. Тип формирования целома путем отделения мезодермальных мешочков от кишечника. Типично для большинства вторичноротых. См. также **Шизоцельный**.

Энтодерма. От греч. «эндон» — внутри. Самый внутренний зародышевый слой; образует эпителиальную оболочку дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и вспомогательных органов (например, печени, поджелудочной железы), пищеварительного тракта. У эмбрионов амфибий энтодермой становятся богатые желтком клетки вегетативного полушария. У эмбрионов амниот энтодерма является наиболее вентральной из трех зародышевых листков, а также образует эпителий желточного мешка и аллантоиса.

Энтomezодерма. Сочетание энтодермальных и мезодермальных клеток. См. также **Мезентодерма**.

Энхансер. Последовательность ДНК, которая контролирует эффективность и скорость транскрипции с конкретного промотора. Энхансеры связывают специфические факторы транскрипции, активирующие ген, путем (1) рекрутирования ферментов (таких как гистонацетилтрансферазы), которые разбирают нуклеосомы, или (2) стабилизации комплекса инициации транскрипции.

Энхансер сплайсинга. Цис-действующая последовательность на пре-мРНК, которая способствует сборке сплайсосом в сайтах расщепления РНК.

Энхансерная модульность. Принцип, согласно которому наличие множества энхансеров позволяет белку экспрессироваться в нескольких различных тканях, но не экспрессироваться вообще в других, в соответ-

ствии с комбинацией белков факторов транскрипции, которые связывают энхансеры.

Эпендима. Эпителиальная выстилка спинномозгового канала и желудочков головного мозга.

Эпендимные клетки. Эпителиальные клетки, которые выстилают желудочки головного мозга и спинномозговой канал; выделяют спинномозговую жидкость.

Эпиаллели. Варианты структуры хроматина, которые могут наследоваться из поколения в поколение. В большинстве известных случаев эпиаллели представляют собой различия в паттернах метилирования ДНК, которые способны влиять на зародышевую линию и, таким образом, передаваться потомству.

Эпибласт. Наружный слой утолщенного края бластодермы у гастролы рыбы или верхний слой двухслойного зародыша амниот (рептилий, птиц и млекопитающих). Эпибласт содержит предшественники эктодермы у рыб и предшественники всех трех зародышевых листков самого эмбриона (плюс амнион) у амниот. Образует хорион и аллантоис у птиц.

Эпиболлия. Движение эпителиальных слоев (обычно эктодермальных клеток), которые распространяются как единое целое (а не индивидуально) и охватывают более глубокие слои эмбриона. Эпиболлия может происходить в результате деления клеток, изменения их формы или интеркаляции нескольких слоев клеток в меньшее количество слоев. Часто задействованы все три механизма.

Эпибранхиальные плакоды. Подгруппа черепных плакод, образующихся в глоточной области эмбриона позвоночных. Дает начало чувствительным нейронам трех черепных нервов: лицевого (VII), языкоглоточного (IX) и блуждающего (X).

Эпигенез. Точка зрения, поддерживаемая Аристотелем и Уильямом Харви; заключается в том, что органы эмбриона в каждом поколении формируются *de novo* («с нуля»).

Эпигенетика. Изучение механизмов, которые воздействуют на фенотип без изменения нуклеотидной последовательности ДНК. В частности, эти изменения работают «вне генов» (т. е. эпигенетически), влияя на экспрессию гена, но, в отличие от мутаций, не изменяя его последовательность. Эпигенетические изменения иногда передаются будущим поколениям. Это явление называют эпигенетическим наследованием.

Эпидермальные плакоды. Утолщения эпидермальной эктодермы, связанные с эктодермальными придатками. См. также **Плакоды эктодермальных придатков**.

Эпидермис. Наружный слой кожи, формируемый из эктодермы.

Эпикард. Наружная поверхность сердца, которая образует коронарные кровеносные сосуды, питающие сердце. Происходит из полей сердца.

Эпиморфин. Многофункциональный белок: в мембранах мезенхимных клеток он направляет эпителиальный морфогенез; когда его экспрессируют клетки склеротома, он действует для привлечения дополнительных прехондрогенных клеток склеротома в область хорды и нервной трубки, где клетки образуют позвонки.

Эпиморфная регенерация. См. **Эпиморфоз.**

Эпиморфоз. Форма регенерации; наблюдается, когда взрослые структуры подвергаются дедифференцировке, чтобы сформировать массу относительно недифференцированных клеток, которые затем редифференцируются для формирования новой структуры (например, регенерация конечностей амфибий).

Эписомальные векторы. Носители для доставки генов; обычно получают из вирусов, которые не внедряются в ДНК хозяина.

Эпителио-мезенхимные взаимодействия. Индукция путем взаимодействий слоев эпителиальных клеток с соседними мезенхимными клетками. Свойства этих взаимодействий включают региональную специфичность (при совместном расположении один и тот же эпителий развивает различные структуры в зависимости от региона, из которого была взята мезенхима), генетическую специфичность (геном эпителиа ограничивает его способность реагировать на сигналы от мезенхимы, т. е. ответ является видо-специфичным).

Эпителио-мезенхимный переход (ЕМТ). Упорядоченная серия событий, посредством которых эпителиальные клетки становятся мезенхимными. В результате ЕМТ, поляризованная стационарная эпителиальная клетка, которая обычно взаимодействует базальной поверхностью с базальной мембраной, становится мигрирующей мезенхимной клеткой, способной проникать в ткани и формировать органы в новых местах. См. также **Мезенхимо-эпителиальный переход.**

Эпителиальные клетки. Клетки эпителия. См. также **Эпителий.**

Эпителий. Ткань, состоящая из эпителиальных клеток, которые лежат на базальной мембране, плотно связаны между собой и образуют лист или трубку с небольшим внеклеточным матриксом.

Эпифизарные пластинки. Зоны хрящевого роста на проксимальном и дистальном концах длинных костей, обеспечивающие непрерывный рост костей.

Эритробласт. Клетка, созревающая из проэритробласта и синтезирующая огромное количество гемоглобина.

Эритроидная прогениторная клетка. Коммитированная стволовая клетка, способная образовывать только эритроциты.

Эритропоэтин. Гормон, который воздействует на эритроидные прогениторные клетки, превращая их в проэритробласты, которые затем генерируют эритроциты.

Эритроцит. Зрелая красная кровяная клетка, поступающая в кровообращение и доставляющая кислород к тканям. Не способен к делению, синтезу РНК или синтезу белка. У амфибий, рыб и птиц сохраняет бездействующее ядро; у млекопитающих лишен ядра.

Эстрогены. Группа стероидных гормонов (включая эстрадиол), необходимая для полного постнатального развития мюллеровых протоков (у самок) и вольфовых протоков (у самцов). Необходимы для фертильности у обоих полов.

Эструс (течка). От греч. oistros — безумие. Эстрогендоминантная стадия овариального цикла у самок многих млекопитающих, для которых характерна спонтанная или периодическая овуляция; характеризуется проявлением поведения восприимчивости к спариванию.

Эукариотический фактор инициации 4 (eIF4E). Белок, который важен для инициации трансляции. Связывается с 5'-кэп-последовательностью мРНК и содействует белковому комплексу, который обеспечивает разматывание РНК; помещает 3'-конец мРНК рядом с 5'-концом, способствуя ее узнаванию и связыванию с рибосомой. Взаимодействует с эукариотическим фактором инициации 4G (eIF4G), каркасным белком, который позволяет мРНК связываться с рибосомой.

Эукариоты. Организмы, чьи клетки содержат мембранные органеллы, в том числе ядро с хромосомами, которые подвергаются митозу. Могут быть одноклеточными или многоклеточными.

Эухроматин. Сравнительно открытое состояние хроматина, в котором находится большинство генов организма, многие из которых способны транскрибироваться. Сравните с **Гетерохроматин.**

Эфрины. Юкстакринные лиганды. Связывание между лигандом эфрина на одной клетке и Eph-рецептором на соседней клетке приводит к тому, что сигналы посылаются обоим клеткам. Эфриновые сигналы часто являются сигналами либо притяжения, либо отталкивания и часто направляют миграцию клеток и определяют, где должны формироваться границы зачатков. Направляют миграцию клеток нервного гребня и участвуют в образовании кровеносных сосудов, нейронов и сомитов.

Эфффекторы нервного гребня. Транскрипционные факторы (например, MITF и Rho GTPase), активируемые спецификаторами нервного гребня, которые придают клеткам нервного гребня их миграционные свойства и некоторые из их дифференцированных свойств.

Эфферент. Структура, уносящая от чего-либо. Термин часто используют в отношении нейронов, которые несут сигналы от центральной нервной системы (головного и спинного мозга) к периферической нервной системе и иннервируемым органам (например, мышцам), или в отношении сосудов, которые уносят жидкость от структуры или органа. Сравните с **Афферент.**

Эфферентные протоки. Протоки, которые связывают сеть семенника с вольфовым протоком; образованы из реконструированных канальцев мезонефрической почки.

Ю

Ювенильный гормон. Липидный гормон у насекомых, который предотвращает вызванные экдизоном изменения в экспрессии генов, необходимые для метаморфоза. Его присутствие во время линьки гарантирует, что результатом линьки будет другой личиночный возраст, а не куколка или взрослое насекомое.

Юкстакринная сигнализация. Сигнализация между клетками, которые находятся рядом, т. е. в прямом контакте друг с другом.

Юкстакринные взаимодействия. Взаимодействия белков клеточной мембраны на поверхности одной клетки с рецепторными белками на поверхностях соседних (расположенных рядом) клеток.

Я

Ядерная РНК (гетерогенная ядерная РНК, пре-мРНК). Исходный продукт транскрипции гена; содержит кэп-последовательность, 5'-UTR, экзоны, интроны и 3'-UTR.

Ядро. (1) Мембранная органелла, содержащая эукариотические хромосомы. (2) Организованный кластер тел нейронов мозга с определенными функциями и связями.

Яичник. Структура, в которой созревают женские гаметы (яйцеклетки). У млекопитающих пара яичников располагается в брюшной полости и выводит яйца в яйцеводы. У покрытосеменных растений яичник — это часть пестика, содержащая семязачатки.

Яйцевая камера. Овариола или яйцевая трубочка (более дюжины на яичник), в которой будет развиваться ооцит *Drosophila*.

Яйцеживорождение. Развитие из яиц, остающихся в теле матери, где они продолжают развиваться в течение определенного периода времени, как у некоторых рептилий и акул. Сравните с **Живорождение**.

Яйцeroждение. Развитие из яиц, отложенных матерью, как у птиц, амфибий и большинства беспозвоночных.

Яйцо. Зрелая яйцеклетка (на стадии мейоза, при котором оно оплодотворяется).

Яйцо амниот. Яйцо, которое развивает внезародышевые оболочки (амнион, хорион, аллантоис и желточный мешок), обеспечивающие питание и другие экологические потребности эмбриона. У рептилий и птиц яйцо обычно развивается в скорлупе вне тела матери; у млекопитающих яйцо модифицировалось для развития внутри матери.

Якорная клетка. Клетка, соединяющая вышележащую гонаду с клетками-предшественниками влагалища у *C. elegans*. Если якорную клетку разрушить, клетки-предшественники влагалища не будут образовывать влагалище, а вместо этого станут частью гиподермы.

Указатель

Латиница

А

Amphioxus 46
Arabidopsis thaliana 88
Archaeopteryx 50
Area opaca 379
Area pellucida 379

В

Bicoid 294
BMP-сигналинг 164

С

C. elegans 272
Cerberus 360
Corona radiata 228
СрG-островки 78
CRE-LOX-система 104
CRISPR/Cas9 99, 103

Д

Danio rerio 362
Disheveled 318
Doublesex 199
Drosophila melanogaster 283
D-бластомер 271

Е

Eco-evo-devo 721

Г

GAL4-UAS-система 104
Гар-гены 299

Н

Hedgehog 127
Нох-гены 398, 597
 в конечности 578
Нох-код, гипотеза 398
Hunchback 296
Hu-белки 93

Ж

JAK-STAT, сигнальный путь 126
JAK-киназы 127

Л

LECA (last eukaryotic common ancestor) 53
LUCA (last universal common fncestor) 47

М

Macho-1 330

Metazoa 258

N

Nanos 294
Noggin 355
Notch-сигналинг 145, 164
NRSE (neural restrictive silencer element) 81

P

Pax6 120

R

Rete testis 188
RNA-Seq-метод 101
Rspo1 191

S

Sex-lethal 197
Sonic hedgehog 131, 593
 сигнальный путь 165
SOX9 191
SRY 191

T

TGFβ-суперсемейство 135

W

WNT3-градиент 654
Wnt-сигналы 360

Z

Zona pellucida 228
 распознавание 246

Нумерованный

3'-UTR 76

5'-UTR 76

Греческий

В

β-катенин 191, 271, 318, 330

Кириллица

А

Абаксиальные мышцы 541
Автотрофность 53
Адгезия 111
Акрон 297
Акросома 224
 акросомная реакция 230, 245
 акросомный вырост 224
Аксонема 224

Алкоголь 685
 Алкогольный синдром плода 685
 Аллантаис 377
 Аметаболия 629
 Амнион 377
 Аналогичные структуры 48
 Аналогия 48
 Ангиогенез 565
 Ангиопоэтины 567
 Андроген 195
 Анеуплоидий 212, 683
 Анизотропия 265
 Анимальная шапочка 317, 336
 Аноикис 167
 Аноректальное соединение 609
 Антиклинальное деление 157
 Анэнцефалия 419
 Апертура 251
 Апикальная
 меристема
 корня 32
 побега 33
 эктодермальная шапочка (АЭШ) 664
 Апикальное сокращение 279, 415
 Апоптоз 39, 602
 Артротом 518
 Архентерон 321, 338
 Атразин 696
 Ауксин 138
 сигнальный путь 140
 Аутокринные взаимодействия 123

Б

Базальная пластинка 117
 Белки
 Activin 136
 Dishevelled 319
 Nodal 136
 Notch 145
 Roundabout 481
 Slit 481
 зеленый флуоресцентный 43
 из семейств Trithorax и Polycomb 83
 морфогенетические белки кости (BMP) 136, 354
 теплового шока 723
 хемотактические 485
 Бивалент 206
 Биндин 231
 Бисфенол А 694
 Бластема 40
 регенерационная 656
 Бластодерма 287, 366, 379
 Бластодиск 365
 Бластомер 27
 морского ежа, детерминация 316
 Бластопор 29, 326, 339
 у рыб 371
 Бластоцель 158, 315

Бластула 27, 336
 вылупившаяся 316
 Близнецы 402
 Бурый жир 543

В

Васкулогенез 565
 Вегетативная ротация 339
 Вентральная бороздка 288
 Вентрикулярная зона 430
 Вентрикулярно-субвентрикулярная зона (В-СВЗ)
 боковых желудочков 162
 Вены
 желточные 567
 омфаломезентерические 567
 Витальные красители 41
 Влагалище 193
 Внеклеточный матрикс 116
 Внутренняя клеточная масса 155
 Водоросли харофитовые 53
 Возраст 629
 Волокна Пуркинье 560
 Волосные фолликулы, циклы роста 512
 Вольфов проток 549
 Вторичноротые 260
 Выворачивание 632

Г

Гаметогенез 28, 31, 203, 216
 у животных 203
 Гаметофит 28, 32
 Гаметы 27, 185
 проникновение в яйцевод 243
 слияние 246
 структура 224
 Ганглий 422, 499
 кохлеовестибулярный (преддверноулитковый) 499
 Гастрюла 27
 Гастрюляция 27, 29, 36, 257, 288, 321, 337
 у *Drosophila* 289
 у морского ежа 321
 у птиц 379
 у улиток 272
 у человека 395
 Гемангиобласты 563
 Гемиметаболия 629
 Гемопоз 571
 Генетика
 обратная 102
 прямая 102
 развития 99
 Генетическая
 ассимиляция 721
 гетерогенность 683
 Генетические
 метки 41
 механизмы разметки тела *Drosophila* 290
 Гензеновский узелок 396
 Генные регуляторные сети 91, 318

Геном 27, 73
 редактирование 103
 репортерный 79
 Геномная эквивалентность 71
 Геномный импринтинг 85
 Гены
cerberus 360
pair rule 291, 299
 гомеотические селекторные 291
 дупликация 710
 и белки материнского эффекта 93, 288
 идентичности
 меристемы цветка 214
 органов цветка 214
 ортологичные 713
 пробела (гар-гены) 291
 роста мозга 444
 сегментации 291, 297, 302
 эукариот 76
 Гермафродит 192
 Гетерометрия 716
 Гетеротипия 718
 Гетеротопия 714
 Гетерохроматин 76
 Гетерохрония 715
 Гибридизация *in situ* 99
 Гидра 652
 Гинандроморфы 197
 Гиперактивация 245
 Гиперморфозис 442
 Гипобласт 368, 379
 вторичный 381
 млекопитающих 392
 первичный 381
 Гипостом 653
 Гипотеза дифференциальной адгезии 113
 Гипокамп субгранулярная зона 162
 Гистиобласты 631
 Гистоны 75
 ацетилирование гистонов 82
 деацетилазы гистонов 82
 метилирование гистонов 82
 Глазной пузырь 501
 Глиальный нейротрофический фактор 463, 553
 Глия 438
 вентрикулярная радиальная 437
 внешняя радиальная 437
 Глотка 607, 609
 Гомеозисный комплекс 305
 Гомологичные структуры 48
 Гомология 48
 Гонады 187
 Гоноциты 209
 Гормон
 антимюллеров 187
 лютеинизирующий 211
 проторакотропный 634
 ювенильный 634

Д

Дарвин Ч. 46
 Дауна синдром 683
 Двойная отрицательная связь 320
 Двухслойные
 животные 258
 зародышевые диски 395
 Дейодиназа 627
 Декстральность 262
 Деламинация 36, 455
 чувствительных ганглиев 499
 Деление 152
 мейотическое 185
 Дермомиотом 518
 Детерминация
 миотома 543
 осей 257
 эмбриона 268
 Диакинез 206
 Дивергенция 708, 711
 Динеин 224
 Дифференциальная
 спецификация 68
 экспрессия генов 71
 Дифференциальное сродство клеток 111
 Дифференцировка 24, 632
 клеток 60
 сердца 563
 скелета конечности 578
 Диффузия паракринных факторов 140
 Диэтилстильбэстрол 692
 Дорсальная губа 339
 Дорсальное закрытие 290
 Дорсальный
 мезентерий 614
 сигнал 348
 Дробление 27, 29, 36, 257, 389
 билатеральное 35, 36
 голобластическое 23, 36, 260, 314, 328
 радиальное 35, 36
 ротационное 35, 36
 спиральное 35, 36
 дискоидальное 34
 меробластическое 23, 35, 365, 379
 дискоидальное 365
 поверхностное 34, 286
 способы 34
 у птиц 379
 яйца ротационное 275
 Дыхательная трубка 607, 617

Ж

Жаберные дуги 38
 Желточная
 клетка 366
 оболочка 227
 пробка 341
 Желточный
 мешок 377
 синцитиальный слой 366

Желтый серп 329
 Желчный пузырь 617
 Живородящие 23
 Животные
 вторичноротые 258
 гребневики 258
 первичноротые 258
 стрекающие 258
 Животные трехслойные 258
 Жизненный цикл 27
 животного 27
 покрытосеменного растения 217
 Жужжальца 305

З

Завязь 219
 Задняя краевая зона 380
 Зародышевая полоска 288
 Зародышевое кольцо 368
 Зародышевые листки 27, 51
 Зародышевый щиток 369
 Зигота 22

И

Имагинальные
 диски 630
 клетки 631
 Имаго 629
 Инвагинация 36
 архентерона 326
 Инвариантная клеточная генеалогия 273
 Инволюция 36, 339
 Ингибирование латеральное 146, 531
 Ингрессия 36
 Индел 103
 Индолил-3-уксусная кислота 138
 Индуктивное взаимодействие 122
 Индуктивные сигналы 454
 Индуктор 119
 Индукция
 ранней почки конечности 582
 черепных плакод 495
 Инозитол-1,4,5-трифосфат 239
 Инструктивное взаимодействие 122
 Инсулиноподобный фактор роста 360
 Интегрины 117
 Интегумент 219
 Интеркинез 206
 Интеркинетическая ядерная миграция 435
 Интерсекс-состояние 196
 Интрон 76

К

Кавитация 391
 Кадгерин 114
 Каллус 648
 Кальций
 влияние высвобождения 238, 239
 инициатор кортикальной реакции 236
 Канализация регенерации сосудов 650

Канцерогенез 698
 Капацитация 243, 244
 Кардиомиоцит 560
 Карта
 презумптивных зачатков 41, 61, 328
 ретино-тектальных проекций 485
 Каскад передачи сигнала 125
 Катенин 114
 Кембрийский взрыв 53
 Кератиноциты 507
 Киназа гликогенсинтазы 3 134
 Кишечная трубка 611
 Клетки
 адгезия 114, 477
 адэпителиальные 631
 вворачивающейся краевой зоны 339
 гемогенного эндотелия 569
 генеративные 218
 гибель 39
 гранулезы 189
 предшественники 188
 деление 38
 зародышевого пути 28
 зернистые 432
 изменение формы 38
 Кахалы–Ретциуса 438, 439
 Лейдига 188
 линии 61
 мезенхимные 38
 мультипотентные 153
 предшественники сердца 563
 нервного гребня 38
 пути миграции 460
 первичные половые 185, 203
 полярные 286
 постсинаптические 488
 предшественники 153
 вульвы 146
 промежуточные 438
 Пуркинью 432
 рост 39
 сателлиты 542
 селективное сродство 113
 Сертоли 187
 сигнализация 119
 смерть во время метаморфоза 625
 теки 189
 типа В 163
 типы движения 36
 эпителиальные 38
 якорные 146
 Клеточная адгезия, молекулы 145
 Клоака 555
 Клоакальная мембрана 612
 Клоногенная неопласта 656
 Кодон терминации трансляции (ТАА) 76
 Кожа 505
 Коммитирование 60
 Компактизация 390

- Комплекс
 Antennapedia 305
 bithorax 305
- Конвергентное растяжение 327
- Конечность
 поле конечности 577
 почки потенции 581
- Консенсусная последовательность 92
- Контактного ингибирования локомоции 458
- Кора мозга
 гирэнцефалическая 442
 лиссэнцефалическая 442
- Кортекс 228
- Кортиев орган 496
- Кортикальная
 гранулярная реакция 235
 пластинка 438
- Кортикальные гранулы 228
- Краевая зона 339
- Краниорахисшизис 419
- Крипта 166
- Кровеносная система 557
- Кроветворение 568
 места 568
- Кроссинговер 206
- Ксилема 33
- Куколка 630
- Кумулюс 228
- Кэп-последовательность 76
- Л**
- Лабииоскротальные складки 194
- Ламинин 117
- Ларинготрахеальный желоб 618
- Лепестки 214
- Лиганд 110
- Линька
 метаморфоза 630
 на имаго 630
- Личинка 28, 629
 вторичная 624
 первичная 623
- Лофотрохозои 258
- М**
- Макромер 261, 314
- Мантис 431
- Материнский
 вклад 93
 эффект 262
- Матка 194
 шейка матки 193
- Матричные РНК
 bicoid и nanos 291
 материнские 288
- Мегаспорангий 219
- Мегаспоры 218
- Медиальная шарнирная точка 413
- Межклеточная коммуникация 110
- Межпальцевая некротическая зона 602
- Мезентобласт 262
- Мезенхима
 вторичная 316
 метанефрогенная 552
 первичная 316
- Мезенхимо-эпителиальный переход (MET) 527
- Мезодерма 27, 515
 боковой пластинки 516, 547
 кардиогенная 558
 промежуточная 516, 548
 соматическая (париетальная) 557
 спланхническая (висцеральная) 557
- Мезодермальная мантия 345
- Мезомер 314
- Мейоз 32, 204, 211
 стадии деления 206
 диктиотена 211
 диплотена 206
 зиготена 206
 лептотена 206
- Меристема 155
 соцветия 156
- Метаморфоз 22, 31, 623
 амфибий, гормональный контроль 626
 насекомых, гормональный контроль 629, 633
- Метанефрос 549
- Метилование ДНК 85, 725
- Мечение красителями 41
- Миграция клеток 39
 коллективная 342, 459, 525
 нервного гребня 455
- Микроворсинки 228
- Микромеры 261, 314
- Микропиле 219, 251, 286
- МикроРНК 95
- Микроспора 218
- Микроспорангий 218
- Микротрубочки, центры организации 212
- Микрофиламент 228
- Миобласт 541
- Миогенные регуляторные факторы (MRF) 543
- Млекопитающие
 вторичное определение пола 193
 гастрюляция 392
 гонадное определение пола 187
 молочная железа 511
 оплодотворение 243
- Многоклеточность 50
- Модульность 708
- Мозг
 задний 422
 передний 422
 подростковый 446
 средний 422
 субвентрикулярная зона 437
- Мозжечек 432
- Моноспермия 232
- Морула 336
- Морфоген 123

Морфогенез 24, 109

органов слуха 497

Мочевой пузырь 555

Мочеточника зачаток 552

Мутации гипоморфные 176

Мутовки 88

Н

Надпочечники, врожденная гиперплазия 196

Наружный зернистый слой 432

Нейральные стволовые клетки 161

Нейрогенез 437

Нейромезодермальные

предшественники 426, 525

стволовые клетки 525

Нейропор

задний 416

передний 416

Нейротрофины 485

Нейрула 31

Нейруляция

вторичная 421

первичная 411

переходная 412

Неограниченный рост 22

Неокортекс 433

Нервная

пластинка 410

система

периферическая 410

центральная 409

трубка 31, 410

дефекты смыкания 419

крыша 424

Нервные валики 412

Нервный

гребень 42, 449

вагусный 451

головной 451, 465

крестцовый 451

сердечный 451, 471

туловищный 451

желобок 412, 415

Нетрин 481

Нефрон 548

Нимфа 629

Нуклеосома 75

О

Овастацин 248

Онкотерапия 704

Оогенез 204, 211

Ооциты 34, 189

II порядка 211

I порядка 211

изолецитальные 34

телолецитальные 34

центролецитальные 34

Оплодотворение 27, 29, 285

двойное 252

у морского ежа, наружное 230

у покрытосеменных растений 250

«цинковая вспышка» 248

Определение пола 185, 213

зависимость от внешних факторов 200

у млекопитающих, способы 186

у покрытосеменных растений 213

хромосомное 186, 197

Опыление 250

Организатор 346, 347

функции организатора 353

Органогенез 28, 31

Органоиды 179

Остеобласты 170

Ось 36

дорсально-вентральная 37, 371, 422

лево-правая 37, 374, 401

у птиц 387

передне-задняя 37, 396, 398, 422

П

Панкреатические β -клетки 616

Паракринная сигнализация, координация 146

Паракринные

взаимодействия 110, 123

факторы 119, 123, 125

Парасегменты 297

Пахитена 206

Первичная

бороздка 381

полоска 381

регрессия 385

ресничка 144

эмбриональная индукция 346, 348

Первичноротые 258

Перицикл 649

Перицит 567

Пермиссивное взаимодействие 122

Пестик 214

Пищеварительная трубка 607

Плакоды 454, 493

черепные сенсорные 494

Пластиды 53

Плацента 378

Плейотропия 682, 720

Плод 219

Плодолистик 219

Плюрипотентность 153

клеток ВКМ, механизмы 158

Пограничная бороздка 431

Полиспермия 233

блоки 248

быстрый 234

медленный 235

предотвращение 232, 246

Половой бугорок 194

Половые тяжи яичка 187

Полость подзародышевая 379

Полюс

анимальный 34

вегетативный 34

- Полярная лопасть 271
 Полярное тельце 212
 Потенция 152
 Почки конечностей 576
 Предзародыш 66
 Пре-мРНК 76
 дифференциальный процессинг 91
 сплайсинг 91
 Преформизм 37
 Прехордальная пластинка 341, 383
 Примаксиальные мышцы 541
 Притягивающее центросомы тело 328
 Прогестерон 245
 Прокамбий 649
 Промотор 76
 с высоким содержанием CpG 84
 с низким содержанием CpG 84
 Пронефрос 548
 Пронимфа 629
 Пронуклеус 27
 Протеогликаны 116
 гепарансульфатсодержащие 140
 Псевдогермафродитизм 196
 Пузырек Купфера 374
 Пыльца 218
 Пыльцевая трубка 218
 Пыльцевые зерна 218
- ## Р
- Развитие 22
 дермомиотома 540
 непрямое 623
 отклонения 56
 прямое 623
 раннее
 Danio rerio 362
 Drosophila 285
 амфибий 333
 млекопитающих 388
 морских ежей 313
 оболочников 327
 птиц 379
 сердца 558
 склеротома 535
 спинного мозга 431
 человека, генетические ошибки 682
 человеческого мозга 441
 Расположение боковых органов
 крестообразное 264
 мутовчатое 264
 спиральное 264
 Расстройства аутистического спектра 177
 Расщелина неба 56
 Регенеративная медицина 176
 Регенерация 639, 640
 de novo 648
 виды 641
 за счет стволовых клеток у плоских червей 655
 и эмбриогенез, различия 642
 компенсаторная 675
 печени млекопитающих 675
 одной клетки за счет одной клетки 647
 способ тотипотентный 647
 тела у животных 652
 у животных, тканеспецифичная 663
 целого растения за счет одной клетки 648
 эволюционный взгляд 643
 Рекрутирование 709
 Репрессоры 78
 Репродукция 32
 Ресегментация 537
 Ретиновая кислота 360, 582
 как тератоген 690
 Рецептор 110
 тиреоидных гормонов 627
 тирозинкиназный 125
 фактора роста фибробластов 126
 Реципрокная индукция, механизмы 552
 РНК
 гетерогенная ядерная (гяРНК) 76
 матричная (мРНК) 73
 механизм интерференции 95
 РНК-полимераза II 76
 Роговой слой 507
 Ромбомер 422
- ## С
- Сайленсер 77, 78, 81
 Саламандра, регенерация конечности 663
 Самовоспроизведение 152
 Сегменты 297
 Секвенирование
 глубокое 100
 с иммунопреципитацией хроматина 100
 Семафорины 478
 Семейство
 BMP 136
 Smad 136
 Wnt 131, 132
 Семена 219
 кожура 219
 Семенники, путь дифференцировки 191
 Семенные каналы 188
 Семядоли 32
 Семязачаток 218
 Сердечная трубка, образование петли 563
 Сердце 557
 Серп Коллера 380
 Сетчатка, образование 502
 Симпоз 726
 Синапс 488
 Синаптомемный комплекс 206
 Синдетом 518
 Синистральность 262
 Синцитиальная
 бластодерма 286
 спецификация 68, 285
 у *Drosophila* 293

Синцитий 68, 286
 Склероз боковой амиотрофический 178
 Склеротом 518
 Слуховая
 чаша 498
 ямка 498
 Слуховой пузырь 500
 Созревание семени 32
 Соленоиды 76
 Сомитогенез 524
 Сомитомеры 524
 Сомиты 31
 Сортировка 111
 Сперматиды 211
 Сперматогенез 204
 Сперматогоний 207
 типа Б 210
 Сперматозоид 224
 анатомия 224
 головка 224
 шейка 226
 Сперматоциты
 II порядка 210
 I порядка 210
 Спецификация
 автономная 61, 64
 идентичности пальцев 596
 кишечной ткани 613
 клеток 59
 лево-правой оси 361
 мезодермы
 конечности 588
 параксиальной 519
 промежуточной 550
 нервного гребня 455
 передне-задняя 293
 условная 64
 Сплайсинг 92
 Сплайсосомы 92
 Спорофит 28
 Стволовые клетки 25, 151
 волосяного фолликула 512
 гемопоэтические 168, 568
 зрелого организма 649
 индуцированные плюрипотентные 87, 176
 интерстициальные (промежуточные) 652
 костного мозга 171
 мезенхимные 170
 меланоцитные 512
 мультипотентные 452
 ниши 154, 159
 принцип популяционной асимметрии при де-
 лении 152
 раковые, гипотеза 703
 регуляция 154
 сперматогональные 188
 типы 151
 унипотентные 154

 эмбриональные 153, 173
 наивные 174
 праймированные 174
 Стереобластула 260

Т

Тельсон 297
 Теория
 морфогенетических полей 699
 соматических мутаций 699
 тканевой реорганизации 699
 Тератогенез 684
 Тератогены 56, 684
 Тератокарцинома 700
 Термотаксис 245
 Тестостерон 188
 Тетрада 206
 Тетраподы 575
 Ткани
 опорные 33
 покровные 33
 сосудистые 33
 Тотипотентность 152
 Точечная (фокальная) адгезия 475
 Трансен 43
 Транскриптомия 101
 Транскрипция 73
 корегуляторы 78
 сайт инициации 76
 факторы 78
 затравочные 87
 с MADS-боксом 87
 Трансляция 73
 сайт инициации (ATG) 76
 Трахеопищеводный свищ 618
 Трисомия 683
 Тромбоцитарный фактор роста 172
 Трофоэктодерма 158
 Тычинки 214
 Тьюринга модель 589

У

Урогенитальный синус 195
 Ухо внутреннее
 анатомия 500
 млекопитающих
 кортиев орган 496
 улитка 496

Ф

Фактор роста
 гепатоцитов 675
 фибробластов 125, 360
 эндотелия сосудов 567
 Фенотипическая гетерогенность 683
 Фетальный
 алкогольный спектр нарушений 686
 рост нейронов 442
 Фибробласты, основной фактор роста 567
 Фибронектин 116, 342

Филлотаксис 264
 Филоподии 322
 Фитогормоны 53
 Флоэма 33
 Фоллистатин 355
 Формирование
 дорсально-вентральной оси 600
 у *Drosophila* 307
 кровеносных сосудов 565
 передне-задней оси 276
 печени 614
 поджелудочной железы 616
 позвонков 537
 право-левой оси 277
 проксимально-дистальной оси конечности 587
 суставов 602
 сухожилий 540
 Фосфолипаза С 237
 Фрагмопласт 53

Х
 Хемоаффинность, гипотеза 486
 Хемотрофины 485
 Хоанобласты 52
 Хоанофлагелляты 50
 Хоаноциты 50
 Хорда 260, 341
 Хордальный вырост 383
 Хордин 355
 Хордомезодерма 341, 516
 Хроматин 75
 состав 75
 Хромосомы
 политенные 73
 Х-хромосома, инактивация 196
 Хрусталик 504

Ц
 Целом 258
 Центральная
 догма биологии 72
 нервная система, рождение 411
 Циклопия 503
 Цис-регуляторные элементы 78
 Цитокины 571
 Цитонем 141
 у позвоночных 142
 Цитоплазматические детерминанты 61

Ч
 Чашелистики 214
 Чередование поколений 55

Ш
 Шарнирные точки, регуляция 415
 Шизоцельный путь 258

Щ
 Щель Браше 341

Э
 Эволюционная
 биология развития 707
 эмбриология 45
 Эволюция 25
 конвергентная 645
 Экдизозои 258
 Экдизон 634
 рецепторы 635
 Экзон 76
 Экспрессия генов дифференциальная 71
 Эктодерма 27
 Эктодермальные придатки 508
 Эмбриогенез 27, 32
 Эмбрион 21
 химерный 41
 Эмбриофиты 53
 Эндобласт 381
 Эндосперма 252
 Эндостальная ниша 170
 Эндотелины 485
 Энергиды 287
 Энтодерма 27, 607
 висцеральная (внезародышевая) 395, 607
 париетальная 395
 первичная 392
 Энтomezодерма 339
 Энхансер 77, 79
 активация 79
 Эпиаллели 724
 Эпибласт 379
 Эпиволия 36
 эктодермы 385
 Эпидермальные плакоды 508
 Эпидермис 410, 505
 происхождение 507
 раневой 664
 Эпителио-мезенхимный переход 118, 324
 Эритропоэтин 571
 Эстрогены 511
 Эукариоты, последний общий предок 53
 Эухроматин 76
 Эфрины 145, 463, 478

Ю
 Юкстакринная сигнализация 145
 координация 146
 Юкстакринные взаимодействия 110, 111

Я
 Яичники, путь дифференцировки 191
 Яйцеводы 193
 Яйцеживорождающие 23
 Яйцекладущие 23
 Яйцеклетка 212, 226
 мезолецитальная 35
 млекопитающих, активация 249
 плазматическая мембрана и оболочка 227
 телолецитальная 35
 узнавание сперматозоида 228
 центролецитальная 35

Рецензенты 12-го издания

Anna Allen, *Howard University*

William Anderson, *Harvard University*

Nicola Barber, *University of Oregon*

Madelaine Bartlett, *University of Massachusetts, Amherst*

Marianne Bronner, *California Institute of Technology*

Timothy Brush, *University of Texas, Rio Grande Valley*

Blanche Capel, *Duke University*

Jacqueline Connour, *Ohio Northern University*

D. Cornelison, *University of Missouri, Columbia*

Dr. Angus Davidson, *The University of Nottingham*

Anna Edlund, *Bethany College*

Elizabeth D. Eldon, *California State University, Long Beach*

Deborah Marie Garrity, *Colorado State University*

Bob Goldstein, *University of North Carolina*

Eric Guisbert, *Florida Institute of Technology*

Jeff Hardin, *University of Wisconsin, Madison*

Richard Harland, *University of California Berkeley*

Marcus Heisler, *The University of Sydney*

Arnold G Hyndman, *Rutgers University*

Zhi-Chun Lai, *Pennsylvania State University*

Michael Lehmann, *University of Arkansas*

Michael Levin, *Tufts University*

Yuanyuan Rose Li, *University of Alabama at Birmingham*

Barbara Mania-Farnell, *Purdue University Northwest*

Adam C. Martin, *Massachusetts Institute of Technology*

David Matus, *Stony Brook University*

Roberto Mayor, *University College London*

Dave McClay, *Duke University*

Claus Nielsen, *University of Copenhagen*

Fred Nijhout, *Duke University*

Lee Niswander, *University of Colorado, Boulder*

Julia Oxford, *Boise State University*

Mark Peifer, *University of North Carolina*

Isabelle Peter, *California Institute of Technology*

Ann Rougvie, *University of Minnesota*

Sabrina Sabatini, *Sapienza University of Rome*

Thomas F. Schilling, *University of California, Irvine*

Nick Sokol, *Indiana University*

Richard Paul Sorrentino, *Auburn University*

Ana Soto, *Tufts University*

David Stachura, *California State University, Chico*

Claudio Stern, *University College London*

Andrea Streit, *King's College London*

Keiko Sugimoto, *RIKEN*

Jonathan Sylvester, *Georgia State University*

Daniel E Wagner, *Harvard Medical School*

Zhu Wang, *University of California, Santa Cruz*

Paul M. Wassarman, *Icahn School of Medicine at Mount Sinai*

Daniel Weinstein, *Queens College, CUNY*

Jessica LaMae Whited, *Harvard University*

Jeanne Wilson-Rawls, *Arizona State University*

Colleen Winters, *Towson University*

Tracy Young-Pearse, *Harvard Medical School*

Минимальные системные требования определяются соответствующими требованиями программ Adobe Reader версии не ниже 11-й либо Adobe Digital Editions версии не ниже 4.5 для платформ Windows, Mac OS, Android и iOS; экран 10"

Учебное электронное издание

**Барреси Майкл Дж. Ф.
Гилберт Скотт Ф.**

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Ведущий редактор канд. биол. наук *В. В. Гейдебрехт*
Художественные редакторы *В. А. Прокудин, И. К. Дилоян*
Технический редактор *Т. Ю. Федорова*
Корректор *И. Н. Панкова*
Компьютерная верстка: *В. И. Савельев*

Подписано к использованию 11.01.22.
Формат 200×275 мм

Издательство «Лаборатория знаний»
125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3
Телефон: (499) 157-5272
e-mail: info@pilotLZ.ru, <http://www.pilotLZ.ru>

М. Дж. Ф. БАРРЕСИ, С. Ф. ГИЛБЕРТ

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Перевод нового издания известного учебника «**Биология развития**» **М. Дж. Ф. Барреси** и **С. Ф. Гилберта** возвращает читателей к основополагающим идеям этой быстро развивающейся междисциплинарной науки: регенерации, морфомеханике, развитию растений и генетическому контролю развития.

Издание претерпело ряд изменений:

- расширена глава по регенерации, теперь она не только уникально отражает захватывающие проблемы постэмбрионального развития, но и объясняет логическую основу механизмов регенерации;
- обновлены главы об оплодотворении, дроблении, гаструляции, раннем развитии позвоночных, клеточной дифференцировке и клеточных взаимодействиях в процессе развития;
- включена информация о биологии растений;
- представлен новый материал о морфомеханике развития во время гаструляции у дрозофилы и формирования легких млекопитающих;
- особое внимание уделено использованию полногеномных подходов.

Книга отлично иллюстрирована и станет путеводителем по густой сети текстов, онлайн-ресурсов и бесконечно растущего объема научной информации.

Предназначена для студентов и аспирантов биологических и медицинских вузов, а также их преподавателей. Будет полезна учащимся старших классов школ для более глубокого изучения предмета.